LA RICERCA

IN CLINICA E IN LABORATORIO

diretta da:
HANS VON BEHRING - MARIO BRACCO - BOTHO BÖSEL

---

numero speciale dedicato a:

LA SIEROLOGIA
DEI GRUPPI SANGUIGNI

di: CHRISTIAN MUELLER-ECKHARDT

LA RICERCA IN CLINICA E IN LABORATORIO *numero speciale dedicato a:*

LA SIEROLOGIA DEI GRUPPI SANGUIGNI

di:

CHRISTIAN MUELLER-ECKHARDT

Supplemento al n° 4 (Ottobre-Dicembre 1974)
de La Ricerca in Clinica e in Laboratorio

LA RICERCA

IN CLINICA E IN LABORATORIO

LA SIEROLOGIA DEI GRUPPI SANGUIGNI

di:

CHRISTIAN MUELLER-ECKHARDT

INDICE

Concetti fondamentali 1

Genetica 9

Sistemi dei gruppi sanguigni 11

1) Il sistema AB0 11
2) Il sistema *Rhesus* 16
3) Il sistema MNSs 22
4) Il sistema P 23
5) Il sistema *Lewis* 24
6) Il sistema *Kell* 25
7) Il sistema *Duffy* 26
8) Il sistema *Lutheran* 26
9) Il sistema *Kidd* 27
10) Fattori sanguigni molto frequenti o molto rari 28

Tecniche 29

Generalità 29

Tecniche della sierologia dei gruppi sanguigni 31

Il *test* dell'antiglobulina (*test* di Coombs) 34

Applicazioni 47

La trasfusione di sangue 47
Medicina perinatale 53
Medicina legale 56

Bibliografia 57

NUMERO SPECIALE DICEMBRE 1974

Titolo originale dell'opera:
BLUTGRUPPENSEROLOGIE

© Laboratoriumsblätter für die
medizinische Diagnostik

UNICA TRADUZIONE AUTORIZZATA IN LINGUA ITALIANA
A CURA DE « LA RICERCA IN CLINICA E IN LABORATORIO »

Printed in Italy

Prof. Dr. med. C. Mueller-Eckhardt
Medizinische Kliniken und Polikliniken
der Universität Giessen
Abteilung für Klinische Immunologie und Bluttransfusion

Concetti fondamentali

La sierologia dei gruppi sanguigni è parte dell'immunologia. Nella misura in cui questa ha per oggetto lo studio delle reazioni immunologiche del sangue, essa è detta immunoematologia. La sierologia dei gruppi sanguigni è conseguentemente parte dell'immunoematologia. Essa studia i caratteri geneticamente determinati dei componenti corpuscolari e plasmatici del sangue. Per la ricerca di questi essa si serve di metodi immunologici. Poiché i costituenti dei gruppi sanguigni, in ragione della loro struttura biochimica, agiscono spesso come antigeni e possono indurre in un organismo geneticamente differente la formazione di anticorpi rivolti specificamente contro di loro, essi vengono caratterizzati con l'ausilio di tali anticorpi.

La conoscenza di queste interdipendenze risale alla fondamentale scoperta dei gruppi sanguigni AB0 fatta oltre 70 anni fa (LANDSTEINER). Da allora si è trovato un numero grandissimo di antigeni e sistemi gruppo-ematici legati non solo agli eritrociti, ma anche ai granulociti, linfociti, trombociti, cellule tessutali e ad altri componenti del sangue, come immunoglobuline, α_2-globuline, lipoproteine e molti altri ancora. L'acquisizione di queste conoscenze ha consentito non solo una larga applicazione clinica nel settore della medicina trasfusionale, della medicina dei trapianti e delle malattie immunopatologiche, ma è servita da stimolo anche in molti altri settori di ricerca e di applicazione (genetica ed antropologia, immunochimica, medicina legale, etc.).

I gruppi sanguigni, o fattori sanguigni in senso stretto, sono caratteri ereditari (cioè geneticamente determinati) degli eritrociti, con struttura di antigene che, introdotti in un organismo geneticamente differente, possono portare alla formazione di anticorpi specifici. La definizione di un gruppo sanguigno (antigene) presuppone quindi l'esistenza di anticorpi che ad esso si oppongono. I gruppi la cui formazione viene controllata dallo stesso punto del cromosoma (*locus*) e che di conseguenza sono geneticamente allelici, si definiscono come un *sistema* di gruppi sanguigni.

Gli equivalenti biochimici dei gruppi sanguigni sono strutture della superficie degli eritrociti, finora conosciute solo in parte. I gruppi sanguigni più importanti, per esempio quelli del sistema AB0, sono costituiti da una struttura fondamentale di glicolipidi, alla quale si attaccano residui di zuccheri specifici, che fungono da gruppi immunodeterminanti.

Morfologicamente, ci si può immaginare la superficie degli eritrociti come un « rilievo », con innalzamenti e depressioni su cui sono disposte, secondo una distribuzione determinata ed in numero che varia da sistema a sistema, le macromolecole che determinano i gruppi sanguigni. Ogni determinante della membrana superficiale con carattere di antigene viene generalmente detta anche *recettore*. Si calcola che un solo eritrocita abbia da 800.000 a 1 milione di recettori del sistema AB0, da 10.000 a 30.000 recettori del sistema Rh, da 3.000 a 8.000 recettori del sistema *Kell* e da 1.000 a 3.000 recettori del sistema *Duffy*. Mentre i recettori del sistema AB0 possono essere evidenziati sia nelle regioni più esposte che nelle depressioni della superficie eritrocitaria, gli antigeni del sistema MN si troverebbero soprattutto sugli innalzamenti della medesima, mentre i fattori dei sistemi Rh, *Kell*, *Duffy* e *Kidd* sarebbero prevalentemente nelle depressioni.

Nella determinazione dei gruppi sanguigni hanno importanza non solo le proprietà della superficie della membrana degli eritrociti, ma anche forze elettrostatiche che agiscono tra parete cellulare e plasma circostante.

Come tutti gli altri anticorpi, anche quelli *specifici per i gruppi sanguigni* fanno parte delle immunoglobuline (Ig). Essi sono specifici per determinanti (recettori, fattori, antigeni) che si trovano sulla o nella membrana degli eritrociti e si uniscono a tali determinanti con il meccanismo di una reazione tra antigene ed anticorpo. Fra le 5 classi di immunoglobuline oggi conosciute, si trovano anticorpi specifici per i gruppi sanguigni soprattutto nelle classi IgG e IgM ed in misura minore anche nella classe IgA. Anticorpi delle classi IgD ed IgE, che abbiano specificità per i gruppi sanguigni, non sono stati finora descritti. La loro struttura, costituita da catene pesanti (H) e leggere (L) di polipeptidi, corrisponde a quella delle normali immunoglobuline. Conseguentemente, le molecole IgG hanno 2 « siti combinatori » con i quali si legano agli antigeni, le molecole IgM ne hanno da 5 a 10. Sulla base della diversa grandezza delle molecole nelle varie classi di immunoglobuline (il peso molecolare delle IgG è circa 150.000, delle IgM circa 900.000), del numero dei siti combinatori, nonché della densità e localizzazione dei recettori alla superficie degli eritrociti, risulta comprensibile il comportamento sierologico dei diversi anticorpi. A parità di densità dei recettori bastano 3-4 molecole IgM per ogni paio di eritrociti per determinare un'agglutinazione riconoscibile, mentre sono necessarie da 80 a 100 ed anche più molecole IgG. D'altra parte, quando i recettori si trovano negli avvallamenti della superficie degli eritrociti, le piccole molecole IgG non sono in grado, in determinate situazioni, di coprire la distanza esistente tra due recettori posti su due eritrociti diversi. Sono invece in grado di colmare questo vuoto le molecole IgM più grosse.

Quando si costituisce un legame immunologico dell'antigene con l'anticorpo corrispondente, si parla di *reazione antigene-anticorpo.* Le reazioni tra antigene ed anticorpo più importanti per la sierologia dei gruppi sanguigni sono l'*emoagglutinazione*, nelle sue diverse varianti, e l'*emolisi.* L'emoagglutinazione è l'agglutinazione visibile degli eritrociti per mezzo di un antisiero specifico. Dal punto di vista chimico-fisico, un'agglutinazione visibile degli eritrociti corrisponde al collegamento in forma di rete di numerosi eritrociti per mezzo degli anticorpi, che con i loro siti combinatori si fissano ciascuno su due globuli rossi vicini. Per emolisi si intende la lesione della parete eritrocitaria con fuoriuscita dell'emoglobina.

Una reazione tra antigene ed anticorpo, indipendentemente dalla forma in cui si manifesta (agglutinazione, emolisi), si svolge *in vitro* in 2 fasi: 1) fase di legame o di adsorbimento specifico dell'anticorpo all'antigene eritrocitario; 2) fase di evidenziazione della reazione. La velocità con la quale si compie questo processo dipende dalla concentrazione delle sostanze che partecipano alla reazione, dalle proprietà dell'antigene e del suo anticorpo, nonché dalle condizioni chimico-fisiche, nelle quali ha luogo la reazione immunologica.

Il legame degli anticorpi con l'antigene loro corrispondente non è di natura chimica, ma è determinato da forze elettrostatiche o di van der Waals. Conseguentemente, le reazioni tra antigeni ed anticorpi in linea di massima sono reversibili. Semplicemente modificando l'ambiente (acidificazione, riscaldamento, etc.) è possibile separare nuovamente un anticorpo specifico dal suo antigene. Questo « distacco » di anticorpi, denominato « eluizione », è importante ai fini della differenziazione di anticorpi specifici per i gruppi sanguigni.

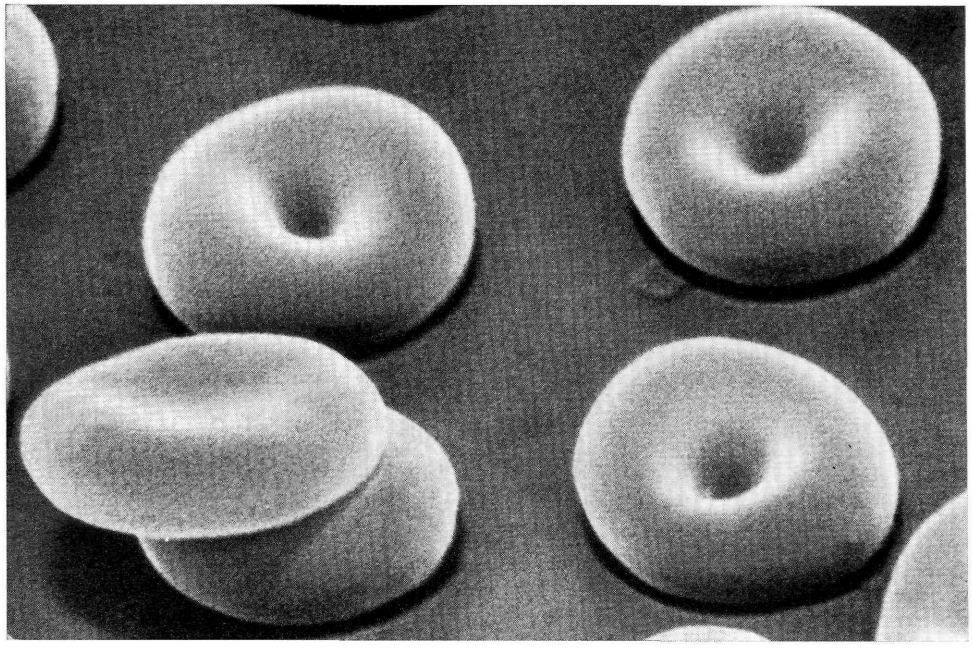


Fig. 1 - Micrografia elettronica a scansione di eritrociti, eseguita dopo aver messo il sangue in soluzione isotonica di citrato di sodio. Diluizione 1:5; circa 9.000 x.

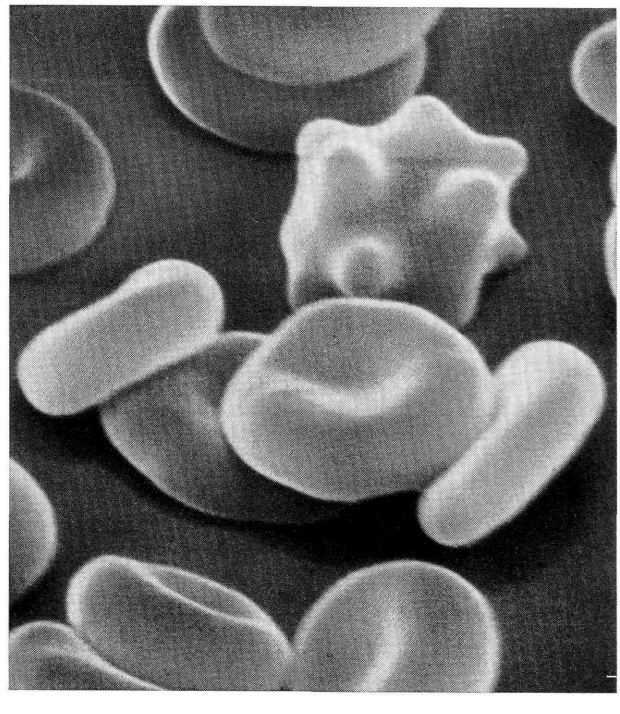


Fig. 2 - Micrografia elettronica a scansione di eritrociti conservati per 3 h a temperatura ambiente. Le superfici cellulari hanno subìto lievi alterazioni; circa 8.000 x.

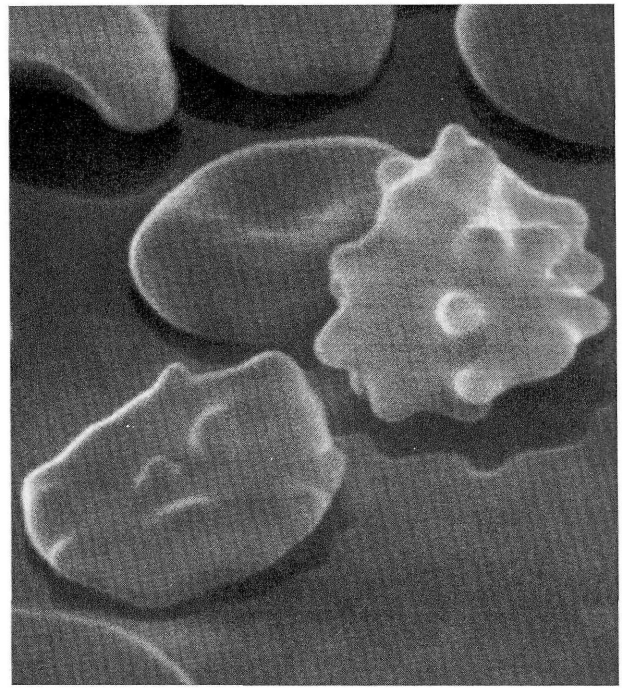


Fig. 3 - Micrografia elettronica a scansione di eritrociti conservati per 7 h a temperatura ambiente. Questi eritrociti, dello stesso campione di sangue di cui alle figg. 1 e 2, hanno subìto notevole deformazione della superficie.

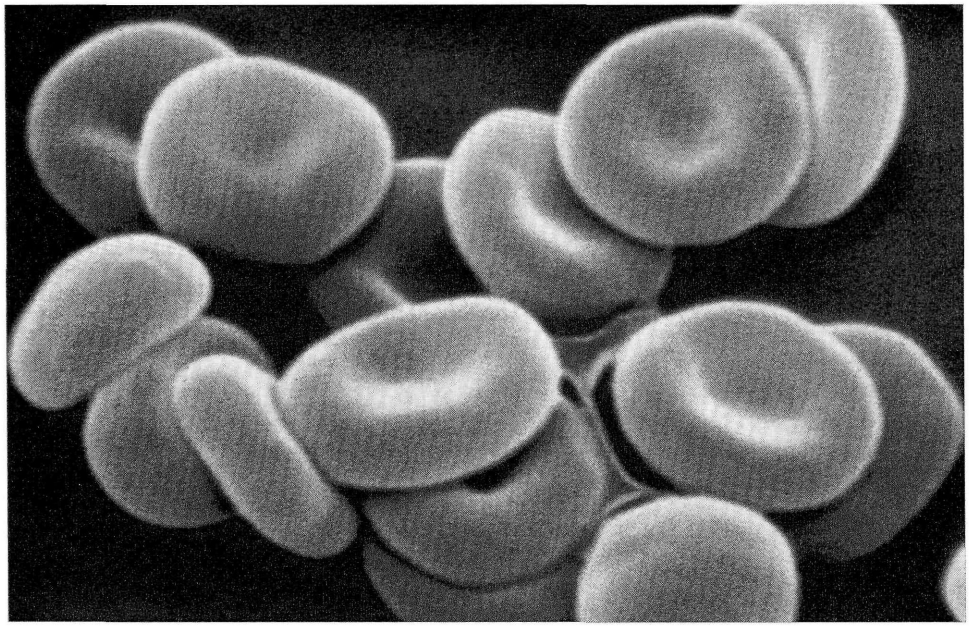


Fig. 4 - Micrografia elettronica a scansione di eritrociti agglutinati; circa 12.500 x. (Le micrografie originali delle figg. 1-4 sono state fornite dal Dott. I.-E. Richter).

Non di rado in un siero contenente un anticorpo specifico per un determinato gruppo sanguigno si trovano anche anticorpi specifici per altri antigeni eritrocitari. Per scomporre tale miscuglio di anticorpi nei suoi singoli componenti, si ricorre appunto alle tecniche di adsorbimento e di eluizione.

Il siero viene incubato con eritrociti aventi uno degli antigeni contro cui sono diretti i suoi anticorpi. Queste cellule perciò adsorbono l'anticorpo corrispondente: dopo aver separato gli eritrociti dal siero (per centrifugazione), questo risulterà parzialmente purificato. Dalle cellule usate per l'adsorbimento sarà poi possibile « eluire » l'anticorpo precedentemente adsorbito. Usando sequenzialmente vari campioni di emazie, con antigeni scelti, è possibile riconoscere la specificità delle diverse popolazioni di anticorpi contenute in un siero.

A seconda del *comportamento sierologico* degli anticorpi, cioè della loro capacità a produrre in determinate condizioni sperimentali una reazione evidenziabile, si distinguono differenti tipi di reazioni, provocate da tipi diversi di anticorpi.

1) AGGLUTINAZIONE COSIDDETTA « COMPLETA »

L'agglutinazione è detta « completa » quando la reazione immunologica tra antisiero ed eritrociti positivi per gli antigeni corrispondenti, fatta avvenire in soluzione fisiologica (0,85 % di cloruro di sodio) e senza altri coadiuvanti, determina agglutinazione visibile. La temperatura ottimale di reazione può essere quella intorno a 37 °C oppure anche « a freddo » (da 4 °C a 25 °C). Gli anticorpi che prendono parte a questa reazione sono detti perciò anticorpi agglutinanti « completi », o anticorpi attivi in soluzione salina. Per la loro struttura chimico-immunologica, essi appartengono di norma alle IgM, ma talora possono essere anche IgG (e IgA).

2) AGGLUTINAZIONE COSIDDETTA « INCOMPLETA »

Una reazione è « incompleta » quando in soluzione fisiologica si ha sì un legame degli anticorpi specifici ai recettori posti sulla superficie degli eritrociti, ma questo non determina agglutinazione visibile. Per evidenziare questo tipo di agglutinazione si richiedono altre condizioni di reazione, che si possono ottenere mediante certe tecniche sierologiche che fanno uso di eritrociti modificati o non in superficie.

Gli anticorpi specifici incompleti si formano quasi sempre in seguito a immunizzazione specifica con cellule sanguigne estranee, ed appartengono prevalentemente alle immunoglobuline della classe IgG.

a) Tecniche con globuli rossi modificati in superficie

Gli anticorpi che sono attivi solo in ambiente proteico o dopo trattamento enzimatico delle emazie vengono detti, nel linguaggio sierologico, anticorpi « incompleti » o anticorpi conglutinanti in presenza di albumina.

1) Test *in ambiente ad elevata concentrazione proteica.* Mettendo gli eritrociti in soluzione ad elevata concentrazione proteica (albumina bovina dal 20 al 30 %, siero AB, gelatina, etc.), si ottengono due risultati: a) la riduzione della costante dielettrica del mezzo, e b) la trasformazione morfologica delle emazie con livellamento dei contorni della superficie. La conseguenza di ciò è che la forza di repulsione delle emazie

viene ridotta e che i recettori posti negli avvallamenti della superficie degli eritrociti sono più facilmente accessibili ai siti combinatori delle molecole IgG.

2) Test *con enzimi.* Gli enzimi proteolitici (bromelina, papaina, tripsina, ficina) scompongono le sostanze mucoidi alla superficie degli eritrociti: di conseguenza si ha anche qui, così come in ambiente proteico, livellamento della superficie, con conseguente migliore accessibilità dei recettori degli eritrociti (per esempio antigeni Rh) per le immunoglobuline della classe IgG.

b) Tecniche con eritrociti non modificati

1) Test *con antiglobuline umane* (test *di Coombs).* La reazione si svolge in 2 fasi distinte. Nella prima fase si ha la fissazione degli anticorpi non agglutinanti « incompleti » agli antigeni della membrana degli eritrociti. In questa fase gli eritrociti non risultano agglutinati. Nella seconda fase (reazione indicatrice), gli eritrociti sensibilizzati vengono indotti ad agglutinazione dall'aggiunta di antisiero eterologo contro le immunoglobuline umane, il quale reagisce con gli anticorpi incompleti fissati alle emazie.

2) Test *di blocco.* Gli anticorpi non agglutinanti incompleti si possono riconoscere anche per il fatto che essi « bloccano » l'azione agglutinante di un antisiero completo di uguale specificità. Si deve immaginare questo meccanismo nel senso che gli anticorpi incompleti ad effetto bloccante sono già fissati in quei punti nei quali dovrebbero andarsi a fissare gli anticorpi completi per poter produrre agglutinazione.

Genetica

La struttura ordinata di ogni materiale biologico è sottoposta a leggi severe. L'informazione necessaria è contenuta nel corredo genetico. L'equivalente morfologico dell'eredità è costituito dai cromosomi, i quali sono strutture allungate disposte in paia nel nucleo di ogni cellula del corpo. L'uomo possiede 22 coppie di cromosomi simili per grandezza e conformazione (autosomi) e 2 cromosomi sessuali non appaiati (cromosoma X e Y), complessivamente quindi 46 cromosomi. Ciascuna delle due metà della serie completa dei cromosomi proviene da un genitore. Per una particolare forma di divisione cellulare (meiosi), le cellule diploidi (cellule con una serie cromosomica completa) danno origine ai gameti, che sono aploidi e portano solo una metà dei cromosomi (uno per ogni coppia). Nel processo della fecondazione si uniscono il nucleo dell'ovulo e quello dello spermatozoo, ricostituendo nuovamente una serie completa di cromosomi.

Sul cromosoma sono disposti in senso longitudinale i veri portatori dei caratteri ereditari, i geni, che sono a loro volta costituiti da numerose sottounità, i *codons*. La zona del cromosoma, nella quale si trova un determinato gene, è detta *locus*. I geni che sono localizzati negli stessi *loci*, o « *loci* omologhi », di un paio di cromosomi, sono detti geni alleli o allelomorfi. Ad ogni sistema di gruppi sanguigni appartengono almeno 2 alleli. Quando in una popolazione si trovano più di 2 alleli allo stesso *locus*, si ha « allelia multipla » (per esempio i sottogruppi del gruppo sanguigno A: A_1, A_2, A_3, etc.). Se gli alleli nei 2 *loci* omologhi sono identici, il portatore del carattere è omozigote per quanto riguarda questo carattere ereditario; in caso contrario è eterozigote. Un esempio di portatore di carattere ereditario omozigote è una persona con il gruppo sanguigno A, che ha ereditato l'allele A sia dal padre sia dalla madre, e conseguentemente possiede il genotipo AA; se invece una persona con il gruppo sanguigno A ha ereditato da un genitore l'allele A e dall'altro l'allele 0, questa persona in relazione al gruppo sanguigno A è eterozigote.

Vi sono alcuni geni per gruppi sanguigni diversi (cioè non completamente allelici) che si trovano strettamente « associati » su un cromosoma (vedi per esempio la trasmissione ereditaria dei geni M, N ed S, s).

I geni possono influenzarsi reciprocamente nel determinare i caratteri da essi controllati. Un gene cosiddetto « dominante » reprime la manifestazione del gene corrispondente (= gene « recessivo »). I geni recessivi possono far apparire il carattere ad essi corrispondente solo se si trovano allo stato omozigote. Se in un individuo eterozigote entrambi gli alleli si esprimono con uguale forza, si dicono codominanti. Un esempio di alleli codominanti è dato dai caratteri dei gruppi sanguigni $Duffy^a$ e $Duffy^b$. « Amorfo » viene infine detto un gene che è inattivo e non determina la formazione di un antigene. Esempi di geni « amorfi » sono il gene « d » del sistema Rh ed il gene « 0 » del sistema AB0.

La somma di tutti i caratteri, così come essi sono rilevabili, viene detta *fenotipo*. Il fenotipo non si identifica completamente con l'insieme dei geni, cioè il genotipo, in quanto non tutti i geni si trovano espressi nel fenotipo. Anche nella sierologia dei gruppi sanguigni occorre perciò distinguere tra i caratteri sierologicamente deter-

minabili e che sono una parte del fenotipo, ed i relativi geni che li controllano. Non sempre è possibile risalire al genotipo partendo dal fenotipo. In tali casi è talvolta possibile ricavare il genotipo sulla scorta di esami nell'ambito della famiglia dell'individuo sotto studio.

Sistemi dei gruppi sanguigni

1) IL SISTEMA AB0

Il sistema più importante dei gruppi sanguigni umani è il sistema AB0. A seconda che siano presenti o manchino gli antigeni A e B, i gruppi sanguigni umani possono essere suddivisi in A, B, AB oppure 0, indicando 0 la mancanza degli antigeni A e B.

Gli antigeni del sistema AB0 sono localizzati sulla superficie degli eritrociti e possono essere evidenziati già dal 3° mese di vita fetale. Alla nascita tuttavia i recettori non sono ancora pienamente sviluppati. La loro concentrazione aumenta continuamente nel corso del 1° e 2° anno di vita. La frequenza dei gruppi sanguigni AB0 è in Germania per il gruppo A 43,4 %, per il gruppo B 12,5 %, per il gruppo AB 4,9 % e per il gruppo 0 39,1 %. Per quanto riguarda l'Italia, la distribuzione delle frequenze è complessa: diversa al nord (dove è simile a quella dell'Europa Centrale) rispetto al centro, al sud e alle isole.

Le sostanze del tipo A e B, oltre che sugli eritrociti, si ritrovano anche sulla maggior parte delle altre membrane cellulari dell'organismo umano. Esse si trovano in forma solubile nei soggetti cosiddetti « secretori » nel plasma sanguigno e nei secreti delle ghiandole escretrici (saliva, succo gastrico, liquido lacrimale), come pure nel sudore, nell'urina, nella bile, nel latte e nello sperma. Appartiene ai « secretori » circa l'80 % della popolazione; i rimanenti sono « non secretori ».

Per la determinazione dei gruppi sanguigni AB0 vengono impiegati antisieri con le specificità anti-A, anti-B ed anti-AB. Per evitare che questi sieri vengano scambiati, essi sono colorati (per esempio anti-A blu, anti-B giallo, anti-AB non colorato).

L'esame della secrezione di sostanze del tipo ABH più semplice è quello fatto sulla saliva. Il metodo preferito è un *test* di neutralizzazione o di inibizione: con l'aggiunta di saliva ad un siero anti-A o anti-B di titolo noto viene neutralizzata parte degli anticorpi presenti. Dalla differenza rispetto al valore di partenza, la quale viene rilevata con una nuova titolazione dell'antisiero, è possibile risalire alla presenza di sostanza del tipo A o B.

Circa il 20 % della popolazione di razza bianca di gruppo sanguigno A e AB reagisce con un siero anti-A di un soggetto del gruppo B in misura più debole del normale. Queste persone sono portatrici di « sottogruppi » A determinati geneticamente, che vengono detti A_2 (A_2B), A_3 (A_3B), A_4, A_5, A_0, A_m, A_x, etc. (elencati in ordine decrescente rispetto al loro contenuto di antigene). Per distinguere da questi sottogruppi A gli eritrociti che reagiscono normalmente, questi ultimi vengono definiti di gruppo « A_1 ». I sottogruppi A non sono ancora pienamente sviluppati nei neonati. Soltanto nel corso del 1° anno di vita essi giungono a completo sviluppo. Conseguentemente, la determinazione dei sottogruppi A può essere nei lattanti difficile o addirittura impossibile. La frequenza del sangue di gruppo A_2, rispetto alla frequenza di A_1, è di circa 1:5; quella dell'A_3 dovrebbe essere di circa 1:1.000. Gli altri sottogruppi sono ancora più rari. Le forme di transizione tra A_1 ed A_2 vengono dette « forme intermedie ».

La formazione degli antigeni eritrocitari A, B e 0 viene controllata dai geni alleli A, B e 0. Il *locus* da cui dipendono gli alleli per il sistema AB0 è in un paio di cromosomi finora non identificato. Poiché il gene 0 è « amorfo », e non produce quindi alcun antigene evidenziabile, il gruppo sanguigno 0 viene definito per l'assenza degli antigeni A e B. Questa circostanza spiega perché, per il sistema AB0, vi sono solo 4 fenotipi (A, B, AB, 0), mentre vi sono invece 6 diversi genotipi (senza prendere in considerazione i sottogruppi) (tab. 1).

Non è così possibile distinguere sierologicamente i portatori di caratteri allo stato omozigote (per esempio AA, BB) da quelli eterozigoti (per esempio A0, B0). Il genotipo di individui di gruppo A o B può essere dedotto solo mediante esame nell'ambito della famiglia. Viceversa, una persona con il gruppo sanguigno 0 deve essere sempre omozigote 00, deve avere cioè ereditato sia dalla madre sia dal padre il gene 0. Ciò significa che una persona con il gruppo 0 non può avere alcun discendente con il gruppo sanguigno AB, in quanto essa trasmetterà ad ogni figlio il gene 0, e questi può avere dall'altro genitore solo A, B oppure 0.

Anche la formazione dei sottogruppi A e B più deboli è determinata geneticamente. La molteplicità delle varianti osservate viene spiegata con il fatto che vari alleli si esprimerebbero con forza diversa. Oltre agli antigeni A e B è possibile evidenziare negli eritrociti umani un altro antigene, l'antigene H. La sua concentrazione è massima nei globuli di tipo 0; esso può venire però evidenziato anche su eritrociti A e B. La formazione dell'antigene H viene controllata da un gene H, il quale ha influenza anche sulla formazione degli antigeni A e B. La trasmissione ereditaria del gene H è indipendente dai geni A, B e 0. La frequenza del gene H è altissima. La maggior parte delle persone sono omozigoti HH. Sierologicamente, esse non si possono distinguere dal genotipo Hh. Il gene h, allele ad H, si trova raramente. Individui omozigoti hh sono stati scoperti solo molto raramente (LEVINE).

Anche la capacità di secernere sostanze ABH è geneticamente determinata. Il gene responsabile viene detto Se (*Secretor*). Il gene allele è se. I secretori possono essere omozigoti Se/Se oppure eterozigoti Se/se. I non secretori hanno il genotipo se/se. La trasmissione ereditaria dei geni secretori è indipendente da quella dei geni A, B, 0 ed H (tab. 2).

Per la loro struttura chimica, le sostanze del tipo ABH presenti sulla membrana degli eritrociti appartengono alla classe dei glicolipidi. Le sostanze del tipo ABH idrosolubili che si trovano nei secreti sono invece glicoprotidi (mucoidi). Il gruppo determinante, responsabile dell'attività antigenica specifica del gruppo sanguigno,

gruppo sanguigno o fenotipo	A	B	0	AB
genotipo	AA A0	BB B0	00	AB

Tabella 1 - Fenotipi (gruppi sanguigni) e loro possibili genotipi. Eredità con diversa combinazione padre/madre (v. fig. 5, pag. 13).

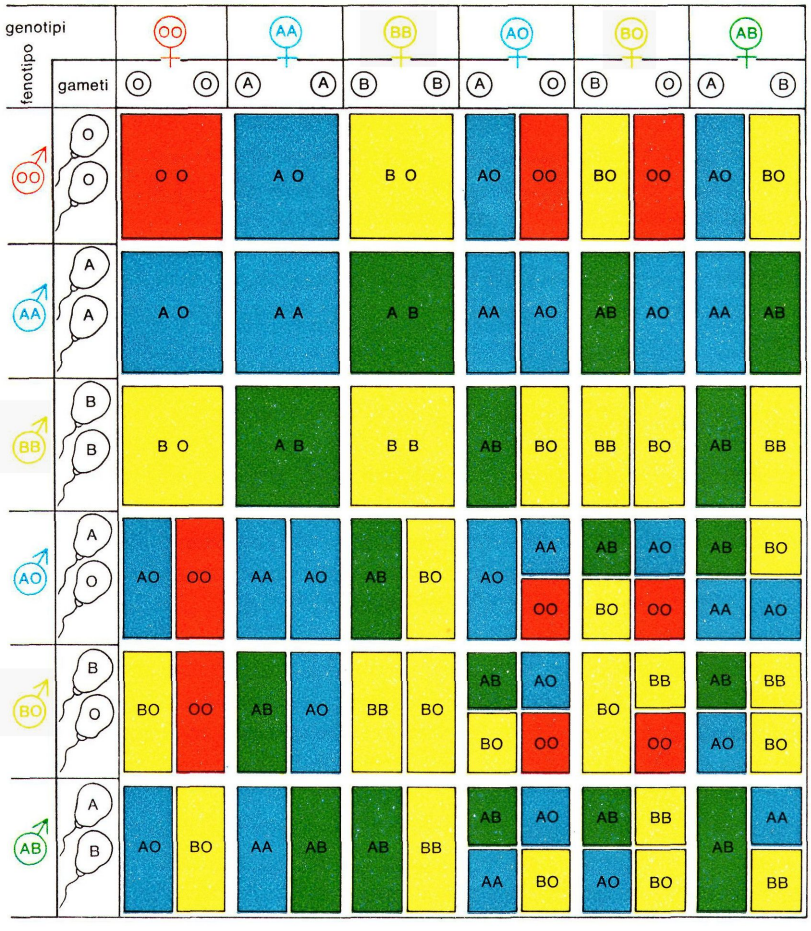


Fig. 5 - Vedere la tab. 1.

gruppo sanguigno	antigeni presenti nei secreti
A	A ed H
B	B ed H
AB	A, B ed H
0	H

Tabella 2 - Sostanze di tipo ABH nei secreti di soggetti « secretori ».

dovrebbe tuttavia essere uguale per entrambe le classi di sostanze. Gli antigeni A, B ed H vengono formati da un unico materiale di base dal quale, con l'aggiunta di elementi strutturali costituiti da zuccheri quali gruppi determinanti, derivano gli antigeni A, B e H. Attraverso diversi passaggi di sintesi si giunge in un primo tempo alla fissazione, che è caratteristica per l'antigene H, di L-Fucoso alla struttura di base. Il gene 0, che è amorfo ed inattivo, non modifica la struttura, per cui negli eritrociti del gruppo 0 si evidenzia un contenuto particolarmente elevato di sostanza H. In persone con il gruppo sanguigno A si viene ad aggiungere all'antigene H un altro zucchero, la N-Acetilgalattosamina, che costituisce il determinante specifico dell'antigene A. Poiché la N-Acetilgalattosamina evidentemente inibisce la capacità di reazione immunologica del L-Fucoso, l'antigene H è evidenziabile sugli eritrociti del gruppo A più debolmente rispetto alle cellule 0. Il gruppo sanguigno B si distingue dal gruppo A solo per il fatto che in luogo della N-Acetilgalattosamina si ha una molecola di D-Galattoso.

ANTICORPI DEI GRUPPI SANGUIGNI AB0

La scoperta dei gruppi sanguigni AB0 è stata resa possibile dal fatto che nel siero di persone adulte normali si possono sempre individuare anticorpi (le cosiddette isoagglutinine) contro quell'antigene o quegli antigeni del sistema AB0, che l'individuo stesso non possiede (*legge di Landsteiner*). Questi anticorpi del sistema AB0, che si trovano regolarmente e sono i cosiddetti anticorpi « naturali », mancano ancora in larga misura nel neonato, si manifestano nel corso del 1° anno di vita e si attenuano nuovamente nell'età senile. In certi stadi patologici essi possono mancare.

Le isoagglutinine presentano grandi variazioni di titolo all'interno di una popolazione. In generale il titolo di anti-A è superiore al titolo di anti-B ed il titolo di anti-A di una persona con il gruppo sanguigno 0 è superiore a quello di una persona con il gruppo sanguigno B.

Dal punto di vista sierologico si possono distinguere 2 forme di isoanticorpi del sistema AB0: gli anticorpi cosiddetti completi od agglutinanti, che reagiscono in modo ottimale in soluzione fisiologica a temperatura ambiente e gli immunoanticorpi incompleti o conglutinanti, attivi preferibilmente a 37 °C nel *test* all'albumina o nel *test* di Coombs indiretto. Questi ultimi possono, in presenza di complemento, determinare l'emolisi degli eritrociti, e vengono quindi detti anche emolisine. Di norma le emolisine si trovano prevalentemente in persone con il gruppo sanguigno 0. Esse si sono prodotte quale conseguenza di stimolazioni immunogene supplementari, per esempio gravidanze con incompatibilità per AB0, iniezione di siero antitetanico equino o di plasma proveniente da donatori aventi un diverso gruppo del sistema AB0, spesso però anche per causa sconosciuta. Per la loro struttura immunochimica, le isoagglutinine complete sono globuline IgM, gli immunoanticorpi del sistema AB0 sono prevalentemente globuline IgG. Esse hanno un ruolo importante nell'eritroblastosi legata al sistema AB0.

Dopo la scoperta dei sottogruppi A si è trovato che i sieri di persone con i gruppi sanguigni 0 e B contengono miscugli di anticorpi (rispettivamente anti-A + anti-B o anti-A), con l'aiuto dei quali è possibile definire, da un punto di vista sierologico, i sottogruppi A. Così il siero anti-A di una persona del gruppo B contiene anticorpi che reagiscono specificamente con l'antigene A_1 ed altri anticorpi che reagiscono con

antigeni più deboli (anti-A + A_1). Facendo adsorbire tale siero con cellule A_2, esso può essere impiegato per la determinazione dei gruppi A_1. Con i sottogruppi A ancora più deboli, un siero anti-A di una persona del gruppo B reagisce solo debolmente o non reagisce affatto. Per contro, il siero di una persona con il gruppo 0 (anti-A + anti-B) presenta netta reazione con tutti i sottogruppi A. Talora nel siero di persone con forme A deboli si trovano anticorpi irregolari contro gli eritrociti del tipo A_1. La loro frequenza riscontrata è del 2 % per il gruppo A_2 e del 26 % per il gruppo A_2B. Nei sottogruppi A, più rari, la frequenza di questi anticorpi irregolari dovrebbe essere ancora maggiore. Dal punto di vista sierologico, essi si comportano come agglutinine a freddo complete. La loro importanza risiede non tanto nella capacità, peraltro messa in dubbio, di determinare disturbi nelle trasfusioni (sebbene in singoli casi questi siano stati descritti), ma piuttosto nel fatto che essi, in combinazione con antigeni A deboli, possono portare a false determinazioni del gruppo sanguigno. Un errore di diagnosi corrente è lo scambiare un campione di sangue di gruppo A_2B avente anticorpo anti-A_1 irregolare, con un gruppo sanguigno « B ».

La determinazione dei sottogruppi A può essere fatta, oltre che con isoagglutinine umane, anche con estratti di semi vegetali. È noto da lungo tempo che gli estratti dei semi di certe piante (= lectine o fitoagglutinine) sono in grado di agglutinare gli eritrociti umani. Due estratti di semi sono particolarmente adatti per la determinazione di sottogruppi A. I semi di *Dolichos biflorus* contengono una lectina anti-A, la quale reagisce in misura molto forte con il sottogruppo A_1, in misura molto debole o nulla con gli altri sottogruppi A. Gli estratti di *Ulex europaeus* (o *Laburnum alpinum*) hanno invece attività anti-H, reagiscono perciò con A_2 e con i sottogruppi A più deboli molto più fortemente che non con A_1. Con l'ausilio di questi 2 estratti si possono distinguere sicuramente i sottogruppi A_1 ed A_2.

La comparsa delle isoagglutinine del sistema AB0 è probabilmente la conseguenza di una immunizzazione, subentrata nel corso della vita, con sostanze ubiquitarie di struttura simile a quelle ABH. Si è così dimostrata per certe strutture batteriche (per esempio colibatteri del ceppo 0_{86}) affinità antigenica con le sostanze dei gruppi sanguigni A e B.

SITUAZIONI PARTICOLARI

Per la *sierologia pratica dei gruppi sanguigni* hanno importanza le seguenti caratteristiche del sistema AB0:

1) la comparsa regolare delle isoagglutinine nel siero consente di determinare i gruppi sanguigni AB0 in 2 modi, e cioè da un lato con la determinazione degli antigeni eritrocitari e dall'altro con la determinazione della specificità delle isoagglutinine nel siero (controprova sul siero). Per una determinazione completa dei gruppi AB0 vanno perciò sempre inclusi entrambi i procedimenti, che devono concordare (tab. 3);

2) la determinazione dei sottogruppi A è possibile nei neonati solo in modo insufficiente, non essendosi ancora completamente sviluppati i recettori ABH. Sembra che la maggior parte dei neonati del gruppo A appartengano al sottogruppo A_2. Una controprova sul siero non è possibile, data la mancanza delle isoagglutinine;

reazione con siero-*test*			gruppo sanguigno	reazione con eritrociti-*test*			
anti-A	anti-B	anti-AB		A_1	A_2	B	0
+	—	+	A	—	—	+	—
—	+	+	B	+	(+)	—	—
—	—	—	0	+	+	+	—
+	+	+	AB	—	—	—	—

Tabella 3 - Isoagglutinine e loro relazione con i gruppi sanguigni.

3) le isoagglutinine possono mancare:

a) nei neonati

b) in pazienti con difetto congenito od acquisito della produzione di immunoglobuline (sindrome da carenza di anticorpi)

c) nel caso di fenomeni particolari a carico del sangue (gemelli provenienti da 2 uova e con gruppi sanguigni diversi nei quali, data la circolazione placentare comune, si è avuto il passaggio di cellule eritropoietiche dall'uno all'altro gemello. Nel circolo di quest'ultimo si trovano di conseguenza 2 popolazioni di eritrociti con gruppo sanguigno diverso, per esempio eritrociti del gruppo 0 e A);

4) anticorpi irregolari contro i sottogruppi A (per esempio anti-A_1) possono portare, in individui con forme A deboli (per esempio A_2B), alla errata determinazione del gruppo sanguigno (per esempio « B » invece di A_2B).

2) IL SISTEMA *RHESUS*

Il carattere Rh del gruppo sanguigno si basa sulla scoperta che, nell'85 % dei campioni di sangue originariamente esaminati da LANDSTEINER e WIENER, gli eritrociti vengono agglutinati da antisieri che questi AA. avevano ricavato per immunizzazione di conigli con eritrociti da scimmie *Rhesus*. Questo antigene viene detto Rh. Da ricerche eseguite successivamente con siero di donna gravida precedentemente scoperto è risultato che si doveva trattare della stessa specificità. Questo primo siero umano anti-Rh reagiva sia con gli eritrociti del bambino sia con quelli del padre. Già poco tempo dopo vennero evidenziati in donne gravide altri anticorpi, che mostravano una relazione con il siero anti-Rh originale ed indicavano quanto complesso fosse questo sistema.

Oggi si distinguono, nel sistema Rh, 5 antigeni principali sierologicamente evidenziabili. Secondo la nomenclatura di FISHER e RACE, che è quella prevalentemente usata in Europa, essi vengono detti D, C, c, E ed e. Negli USA ci si attiene in larga

misura al concetto tradizionale di Rh, designando i singoli tipi di Rh con l'aggiunta di cifre, di trattini o con inversioni delle lettere (Rh_0 = D; rh' = C; hr' = c; rh'' = E; hr'' = e). Il carattere D corrisponde alla denominazione originaria Rh = Rh_0. Gli antisieri, con l'aiuto dei quali vengono definiti questi antigeni, sono detti anti-D, anti-C, anti-c, anti-E ed anti-e. Un siero con specificità anti-d non è finora stato trovato. Il carattere d ha conseguentemente una definizione negativa e se ne suppone la presenza quando la reazione degli eritrociti con anti-D è negativa.

GENETICA DEL SISTEMA Rh

I caratteri del sistema Rh vengono trasmessi ereditariamente come codominanti, secondo le leggi di Mendel (FISHER e RACE). I geni che controllano l'espressione di questi antigeni sono localizzati in una sola ristretta regione cromosomica. Si ritiene (*teoria di Fisher-Race*) che per il sistema Rh esistano 3 *loci* diversi strettamente adiacenti, nella successione: *locus* D, *locus* C, *locus* E. L'associazione di questi *loci* è tanto stretta che i caratteri del sistema Rh vengono regolarmente trasmessi in combinazioni (per esempio CDe o cde). Al *locus* C si trovano gli alleli C e c, al *locus* D gli alleli D e d, al *locus* E gli alleli E ed e. Si conoscono inoltre altri alleli a tutti i 3 *loci*.

Secondo un'altra teoria sul controllo genetico dei fattori Rh (WIENER), esiste un solo *locus* per il sistema Rh su ogni cromosoma. Si distinguono così 8 diversi alleli principali (tab. 4).

Fino ad oggi non è stato ancora definito quale delle 2 teorie principali sulla genetica del sistema Rh sia quella esatta.

Poiché il carattere d non può essere determinato per via sierologica, è impossibile stabilire direttamente il genotipo di un individuo per il fattore D. Viceversa, una persona Rh-negativo, che non reagisca cioè con un siero anti-D, è sempre da considerarsi come omozigote d/d. Il genotipo per il sistema Rh può essere determinato in maniera ineccepibile nella maggior parte dei casi solo con esami nell'ambito della

(denominazione secondo FISHER-RACE)		(denominazione secondo WIENER)		
complesso genico	antigeni	geni	agglutinogeni	fattori
cDe	c, D, e	R^0	Rh_0	Rh_0, hr', hr''
CDe	C, D, e	R^1	Rh_1	Rh_0, rh', hr''
cDE	c, D, E	R^2	Rh_2	Rh_0, hr', rh''
CDE	C, D, E	R^z	Rh_z	Rh_0, rh', rh''
cde	c, e	r	rh	hr', hr''
Cde	C, e	r'	rh'	rh', hr''
cdE	c, E	r''	rh''	hr', rh''
CdE	C, E	r^y	rh_y	rh', rh''

Tabella 4 - Denominazione del sistema Rh (secondo FISHER-RACE e secondo WIENER).

famiglia (fig. 6). La frequenza dei vari fattori Rh in una popolazione è molto varia (tab. 5).

Varianti di Rh

Le varianti sono antigeni strettamente affini agli antigeni usuali del sistema Rh, sono controllate dai medesimi *loci* e si trasmettono ereditariamente secondo le leggi di Mendel. Esse sono probabilmente l'espressione di geni alleli del sistema Rh. Si possono riconoscere con i corrispondenti sieri specifici, oppure per via indiretta attraverso un effetto di dose.

Varianti al locus *C*. La forma più frequente è C^w, che si trova in circa il 2 % della razza bianca. Essa può venire sicuramente determinata con anti-C^w specifico. Si osserva talora immunizzazione contro l'antigene C^w in persone con antigene C normale. Altre varianti, come C^u e C^x, sono estremamente rare e non hanno alcuna importanza pratica.

Varianti al locus *D*. Nonostante l'impiego di sieri anti-D fortemente attivi, i campioni di sangue di certi soggetti reagiscono più debolmente di altri. Vengono definiti eritrociti D^u quelli che mostrano reazione positiva con non tutti i sieri anti-D completi, ma che agglutinano con anticorpi incompleti (con albumina o nel *test* di Coombs). A seconda del tipo e dell'intensità della reazione si distinguono eritrociti D^u « *high-grade* » e « *low-grade* ».

Due sono le cause da prendere in considerazione per le deboli reazioni sierologiche degli eritrociti D^u; da un lato i tipi D^u geneticamente determinati: in queste forme D^u geneticamente determinate si suppone esista un antigene D difettoso. Si suppone infatti che il fattore D sia costituito da diversi antigeni parziali D^A, D^B, D^C, D^E, etc. Se tutti gli antigeni parziali sono pienamente espressi, ne risulta il carattere D normale. Se invece il mosaico degli antigeni parziali è incompleto, si avrà una forma D più debole. Senza prendere in considerazione il tipo e l'estensione del difetto antigenico, tutti i campioni di sangue di questo tipo vengono detti D^u. D'altro lato, esistono i tipi D^u per *interazione dei geni*: è noto che l'espressione di un gene D normale su un cromosoma può venire indebolita dall'influenza di un altro gene sul cromosoma omologo.

Se per esempio una persona eredita da un genitore un complesso Rh con antigene D normale (per esempio CDe) e dall'altro invece Cde, è possibile che il gene C indebolisca l'attività di espressione del gene D sull'altro cromosoma.

Persone con il carattere D^u geneticamente determinato possono venire immunizzate (seppure in casi molto rari) da sangue Rh-positivo. Viceversa, anche un sangue D^u trasferito su persone Rh-negativo può portare alla formazione di un anti-D. Tale siero anti-D, che si oppone all'antigene D^u, non si può distinguere da un normale anti-D; non si conosce cioè un anticorpo anti-D^u specifico. Ne consegue che i portatori del carattere D^u sono da considerarsi Rh-positivo in quanto donatori di sangue ed invece Rh-negativo in quanto riceventi. Nei singoli casi non è possibile distinguere sicuramente la forma D^u da interazione dall'altra forma senza un esame nell'ambito della famiglia.

Varianti al locus *E*. In analogia al fattore D, vi sono anche antigeni E debolmente reattivi, che vengono corrispondentemente detti E^u. Un'altra variante è il carattere

anticorpi anti-					tipo Rh	simboli abbreviati	frequenza (%)
C	c	D	E	e			
—	+	—	—	+	cde/cde	rr	15,1020
—	+	+	—	+	cDe/cde	R_0r	1,9950
—	+	+	—	+	cDe/cDe	R_0R_0	0,0659
—	+	—	+	+	cdE/cde	R''r	0,9235
—	+	—	+	—	cdE/cdE	R''R''	0,0141
—	+	+	+	—	cDE/cDE	R_2R_2	1,9906
—	+	+	+	—	cDE/cdE	R_2R''	0,3353
—	+	+	+	+	cDE/cDe	R_2R_0	0,7243
—	+	+	+	+	cDE/cde	R_2r	10,9657
—	+	+	+	+	cDe/cdE	R_0R''	0,0610
+	+	—	—	+	Cde/cde	R'r	0,7644
+	+	+	—	+	CDe/cDe	R_1R_0	2,1586
+	+	+	—	+	CDe/cde	R_1r	32,6808
+	+	+	—	+	cDe/Cde	R_0R'	0,0505
+	+	—	+	+	cdE/Cde	R''R'	0,0234
+	+	—	+	+	CdE/cde	R_yr	0,0000
+	+	—	+	—	CdE/cdE	R_yR''	0,0000
+	+	+	+	+	CDe/cDE	R_1R_2	11,8648
+	+	+	+	+	cDe/CDE	R_0R_z	0,0125
+	+	+	+	+	CDe/cdE	R_1R''	0,9992
+	+	+	+	+	cDE/Cde	R_2R'	0,2775
+	+	+	+	+	CDE/cde	R_zr	0,1893
+	+	+	+	+	CdE/cDe	R_yR_0	0,0000
+	+	+	+	—	cDE/CDE	R_2R_z	0,0687
+	+	+	+	—	cdE/CDE	$R''R_z$	0,0058
+	+	+	+	—	CdE/cDE	R_yR_2	0,0000
+	—	—	—	+	Cde/Cde	R'R'	0,0097
+	—	+	—	+	CDe/CDe	R_1R_1	17,6803
+	—	+	—	+	CDe/Cde	R_1R'	0,8270
+	—	+	+	+	CDe/CDE	R_1R_z	0,2047
+	—	+	+	+	Cde/CDE	$R'R_z$	0,0048
+	—	+	+	+	CdE/CDe	R_yR_1	0,0000
+	—	+	+	—	CDE/CDE	R_zR_z	0,0006
+	—	+	+	—	CdE/CDE	R_yR_z	0,0000
+	—	—	+	+	CdE/Cde	R_yR'	0,0000
+	—	—	+	—	CdE/CdE	R_yR_y	0,0000

Tabella 5 - I tipi del sistema Rh (secondo PETTENKOFER).

E^w. Entrambe queste varianti sono assai rare. Quantunque i loro portatori possano teoricamente produrre anticorpi con la specificità anti-E, questa possibilità può essere trascurata agli effetti pratici, data la rarità della comparsa di tali varianti.

Numerose altre varianti dei fattori Rh sono state scoperte. Esse hanno importanza soprattutto per problemi genetici.

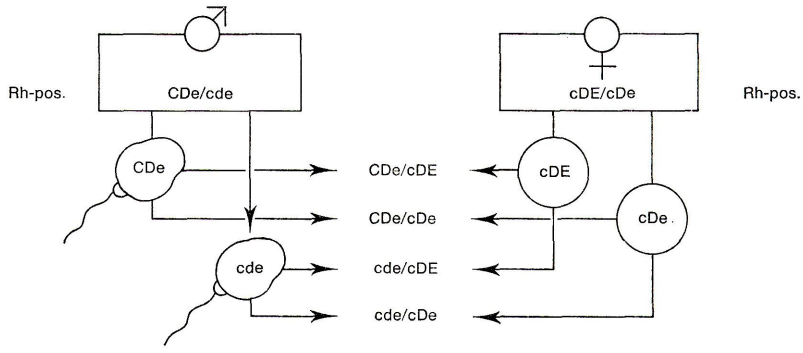
Il riconoscimento di tali varianti è possibile in via diretta ed indiretta. La ricerca diretta presuppone l'impiego di un antisiero specifico (per esempio anti-C^w). Poiché è molto difficile poter disporre di questi antisieri, soprattutto per le varianti più rare, è possibile avere una indicazione indiretta dall'effetto di dose. Si intende con ciò il fenomeno per cui un determinato antisiero dà la reazione più intensa con quegli eritrociti che portano la maggiore concentrazione dell'antigene corrispondente. Per esempio una persona omozigote per il fattore C (C/C) possiede sui suoi eritrociti una « dose » di antigeni C doppia di quella di una persona eterozigote (C/c). Con un determinato siero anti-C gli eritrociti C/C reagiranno fino ad una diluizione superiore a quella cui reagiranno i globuli C/c. Ora, se un sangue non noto reagisce in senso positivo con siero anti-C e negativo con siero anti-c, si dovrà supporre omozigosi quando il titolo dell'antisiero con queste cellule è altrettanto elevato quanto quello dello stesso antisiero con cellule C/C note. I globuli del sangue devono perciò avere una « dose C doppia ». Quando invece il titolo corrisponde a quello con cellule C/c eterozigoti conosciute, è questa un'indicazione per la presenza di variante C.

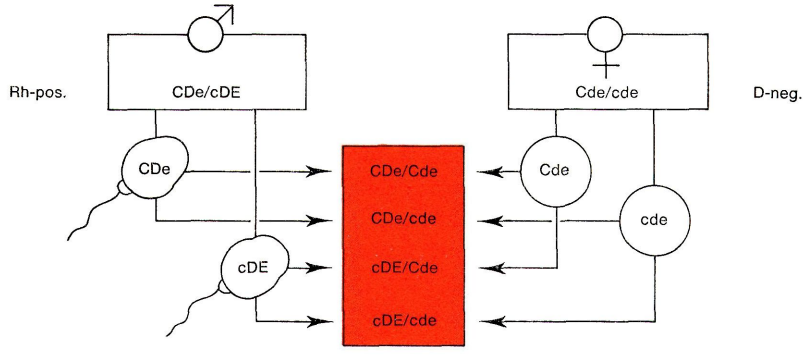
Tale effetto di dose doppia o semplice può essere dimostrato per i caratteri del sistema Rh ad eccezione di D, ma anche per gli antigeni del sistema MNSs, *Duffy* e *Kidd*.

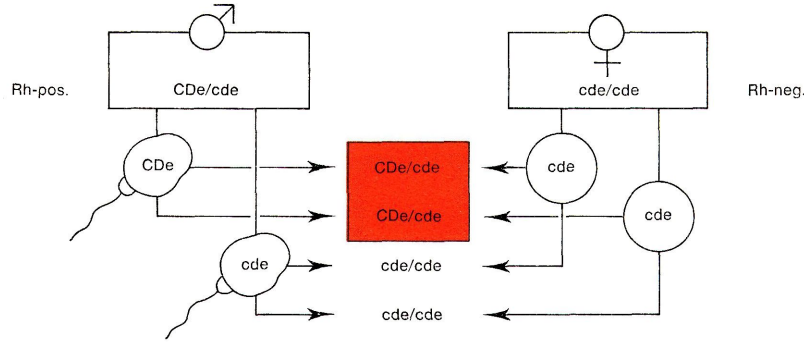
Antigeni Rh mancanti. Sporadicamente sono stati descritti casi di persone i cui eritrociti reagivano con siero anti-D, ma non con anti-C, anti-c, anti-E ed anti-e. La forma di scrittura introdotta per questi tipi di Rh è D- -/D- -. Mediante ricerche nell'ambito delle famiglie si potè scoprire che tali genotipi Rh incompleti si presentano anche in forma eterozigote, per esempio come DCe/D- -. Si sono infine trovate persone i cui eritrociti addirittura non possedevano alcun antigene Rh e che conseguentemente sono state classificate come $Rh\text{-}_{null}$ (- - -/- - -). Dato però che negli eritrociti per lo più si è potuto constatare contemporaneo difetto della membrana, dovrebbe essere possibile mettere questo in relazione causale con la mancanza degli antigeni Rh.

Antigeni Rh composti. Mentre i singoli geni del sistema Rh determinano normalmente l'espressione di un solo antigene (per esempio gene c → antigene c; gene e → antigene e) essi, quando si presentano insieme, possono agire su un cromosoma in modo funzionalmente concomitante, portando alla formazione di un solo prodotto genico. Se contro tale antigene viene prodotto un anticorpo specifico, esso reagisce solo con l'antigene composto e non già con i singoli componenti. Anti-f (ce) si trova relativamente spesso come impurità in sieri anti-c o anti-e, anti-Ce in sieri anti-C. Anti-cE ed anti-CE sono molto rari.

Fig. 6 - Esempi di eredità per i fattori Rh. *In alto*: tutti i discendenti sono Rh-positivo, 50 % D omozigoti-50 % D eterozigoti. *Al centro*: tutti i discendenti sono Rh-positivo, 100 % genotipi D eterozigoti. In tutte le combinazioni geniche è possibile una sensibilizzazione della madre D-negativa del feto: combinazione in grado di determinare malattia emolitica del neonato. *In basso*: i discendenti sono per metà Rh-positivo e per metà Rh-negativo. Nel 50 % delle possibili combinazioni geniche con fattore D-positivo del sistema Rh è possibile una sensibilizzazione della madre da parte del feto: combinazione in grado di determinare malattia emolitica del neonato. ▶


Rh-pos.
CDe/cde
cDE/cDe
Rh-pos.
CDe
cDE
cDe
cde
CDe/cDE
CDe/cDe
cde/cDE
cde/cDe


Rh-pos.
CDe/cDE
Cde/cde
D-neg.
CDe
Cde
cde
cDE
CDe/Cde
CDe/cde
cDE/Cde
cDE/cde


Rh-pos.
CDe/cde
cde/cde
Rh-neg.
CDe
cde
cde
CDe/cde
CDe/cde
cde/cde
cde/cde

reazione con anti-M	anti-N	anti-S	anti-s	fenotipo	genotipo	frequenza (%)
+	—	+	—	MS	MS/MS	7,1
+	—	+	+	MSs	MS/Ms	16,6
+	—	—	+	Ms	Ms/Ms	9,5
+	+	+	—	MNS	MS/NS	2,6
+	+	+	+	MNSs	MS/Ns oppure Ms/NS	16,0
+	+	—	+	MNs	Ms/Ns	14,9
—	+	+	—	NS	NS/NS	1,0
—	+	+	+	NSs	NS/Ns	9,4
—	+	—	+	Ns	Ns/Ns	22,9

Tabella 6 - Il sistema MNSs (secondo PETTENKOFER).

Anticorpi del sistema Rh. Gli anticorpi del sistema Rh sono quasi sempre immunoanticorpi, stimolati dalla trasposizione di sangue di altre persone geneticamente diverse, in occasione di gravidanza o di trasfusione di sangue. Sostanze simili a quelle Rh non sono state finora trovate in natura. Conseguentemente, non ci si deve aspettare la produzione di anticorpi cosiddetti « naturali », come nel caso del sistema AB0. Le sostanze Rh non si trovano nei secreti.

Gli anticorpi con specificità Rh appartengono per la maggior parte alla categoria sierologica degli anticorpi conglutinanti incompleti. Gli antisieri di tipo completo sono ben più rari. Per i primi si tratta prevalentemente di globuline IgG, per gli ultimi di globuline IgM. Gli anticorpi Rh possono di regola venire evidenziati con i *tests* enzimatici, con albumina o con il *test* di antiglobulina indiretto. Certi anticorpi reagiscono solo nel *test* di antiglobulina indiretto.

La frequenza degli anticorpi che si producono in caso di trasferimento di sangue incompatibile è assai differente per i vari antigeni Rh. Evidentemente l'effetto immunogeno dei caratteri Rh varia moltissimo. In successione secondo la loro frequenza si trovano le specificità anti-D (in combinazione con anti-C ed anti-E), anti-c, anti-E, anti-C ed anti-e.

3) IL SISTEMA MNSs

Il sistema MN venne scoperto nel 1927 in esperienze di immunizzazione di animali con eritrociti umani. Solo 20 anni più tardi, nel 1947, venne scoperto il fattore S, e solo nel 1951 l'antigene s.

Le sostanze del gruppo sanguigno MNSs si trovano solo sugli eritrociti, non sono contenute nei secreti e vengono per lo più distrutte in seguito al trattamento degli eritrociti con fermenti proteolitici.

La trasmissione ereditaria del sistema MNSs è indipendente dagli altri sistemi di gruppi sanguigni e segue le leggi di Mendel. I singoli antigeni sono controllati da 2 paia di alleli codominanti (M, N ed S, s) dipendenti da *loci* strettamente associati tra di loro. Con i 4 antisieri anti-M, anti-N, anti-S ed anti-s si possono distinguere 9 fenotipi, che corrispondono a 10 possibili genotipi (tab. 6).

Anticorpi del sistema MNSs. Anti-M ed anti-N sono prevalentemente agglutinine « naturali » complete. A seguito di trasfusioni incompatibili si possono produrre anticorpi immuni incompleti, attivi alla temperatura di 37 °C. Esiste anche una agglutinina a freddo naturale con specificità anti-S. L'anti-s invece si trova solo come anticorpo immune e viene evidenziato preferibilmente con il *test* di antiglobulina indiretto. Gli anticorpi del sistema MNSs mostrano di norma effetto di dose, il quale consente di distinguere tra individui omozigoti ed eterozigoti.

L'importanza pratica dei gruppi sanguigni MN interessa principalmente il settore delle perizie sull'esclusione di paternità. Anti-S ed anti-s vengono presi in considerazione in rari casi, quale causa di reazioni da trasfusione o di malattia emolitica del neonato.

4) IL SISTEMA P

Il sistema P, descritto già nel 1927, si presenta oggi come un sistema straordinariamente complesso.

Il carattere P si trova nell'uomo solo sugli eritrociti. Sostanze simili alle P si trovano però anche nel liquido di cisti idatidee del fegato di pecore ed in certi tipi di vermi. L'espressione del carattere P sugli eritrociti è ancora incompleta alla nascita. Le sostanze P non si trovano nei secreti (tab. 7).

Gli *anticorpi del sistema P* sono agglutinine a freddo naturali. Un anti-P_1 può essere evidenziato con una tecnica sensibile nella maggior parte delle persone P_2. Se tale siero viene fatto reagire con cellule P_1 di diversi individui, si possono riconoscere forti differenze nell'intensità dell'agglutinazione.

reazione con anti-P + P_1	anti-P_1	simbolo	antigeni	genotipi	frequenza europea (%)
+	+	P_1	PP_1	P_1P_1	29
				P_1P_2	50
				P_1P	0
+	—	P_2	P	P_2P_2	21
				P_2P	0
—	—	P	(non scoperti)	PP	0

Tabella 7 - Il sistema P (secondo RACE e SANGER).

reazione con anti-Le^a	reazione con anti-Le^b	fenotipo	frequenza europea (%)
+	—	Le (a+b—)	22
—	+	Le (a—b+)	72
—	—	Le (a—b—)	6

Tabella 8 - Il sistema *Lewis* (secondo RACE e SANGER).

È noto dal 1955 che l'anti-Tj^a, il quale era già stato descritto in precedenza, appartiene al sistema P. Un anti-Tj^a si trova generalmente nel siero di persone p quale anticorpo naturale capace di produrre l'emolisi. Per adsorbimento di tale siero con cellule P_1 e P_2 è possibile dimostrare che il siero anti-Tj^a contiene un miscuglio di anticorpi con le specificità anti-P + P_1 più un altro anticorpo. Questo anticorpo, anti-P^k, specifico per il rarissimo antigene P^k del sistema P, si trova sempre insieme ad altri anticorpi del sistema P.

Gli anticorpi del sistema P hanno scarsa importanza clinica. In rarissimi casi si sono attribuite a tali anticorpi reazioni emolitiche da trasfusione. Per la loro ricerca è opportuno eseguire *tests* in soluzione fisiologica, alla temperatura di 16-20 °C.

5) IL SISTEMA *LEWIS*

Il sistema *Lewis* è basato sulla scoperta nel siero di 2 donne di un anticorpo che mostrava reazione identica e che agglutinava il 24-25 % di tutti i campioni di sangue del gruppo 0. Questo anticorpo venne detto anti-*Lewis*^{a} (Le^a). Poco tempo dopo venne isolato l'anticorpo contro l'antigene Le^b, che fu postulato allele di Le^a. La frequenza dei fenotipi determinabili con l'ausilio di sieri anti-Le^a ed anti-Le^b è varia (tab. 8).

Tra il sistema *Lewis* ed il sistema AB0 esistono stretti rapporti. Così la capacità di secrezione di sostanze ABH è in relazione con l'antigene *Lewis*. Persone del tipo Le (a+b—) non mostrano secrezione di sostanze ABH, mentre questa si ha sempre nelle persone del fenotipo Le (a—b+) e spesso anche nelle persone Le (a—b—).

Sostanze del gruppo *Lewis* si trovano sugli eritrociti e nel plasma. Esse si possono riscontrare nei secreti in funzione del genotipo dell'individuo. Dal punto di vista chimico si tratta, come per gli antigeni del sistema AB0, di glicoprotidi, il cui determinante caratteristico è costituito da L-Fucoso.

Alla nascita i caratteri *Lewis* non sono ancora pienamente espressi. Nel 3° mese post-natale circa l'80 % dei bambini reagisce positivamente con anti-Le^a. Solo a partire dal 2° anno di vita la frequenza degli individui Le^a viene riscontrata intorno al 20 %, pari cioè a quella che si riscontra in individui adulti. La frequenza dell'antigene Le^b è, nei bambini, inferiore a quella degli adulti.

La *trasmissione ereditaria* dei gruppi *Lewis* si basa sulla presenza di 2 paia di geni: L-l ed Se-se. Il primo controlla la presenza nei liquidi organici di sostanze di tipo Le^a, il secondo di sostanze di tipo ABH. La sostanza Le^b viene invece considerata come prodotto dell'interazione di geni L ed Se.

Gli *anticorpi del sistema Lewis* appartengono prevalentemente al gruppo delle agglutinine a freddo complete naturali. Talora essi si trovano anche in forma incompleta come anticorpi immuni. Le agglutinine a freddo complete del sistema *Lewis* vengono evidenziate nel modo migliore con l'agglutinazione in soluzione fisiologica, gli anticorpi incompleti con la tecnica dell'antiglobulina. La loro importanza clinica non è irrilevante, dato che tanto gli anticorpi completi quanto quelli incompleti possono essere causa di gravi incidenti da trasfusione. Essi non vengono invece considerati quale causa di complicazioni nella gravidanza, in quanto gli antigeni *Lewis* giungono a completo sviluppo solo dopo la nascita.

6) IL SISTEMA *KELL*

Il sistema *Kell* viene definito da 3 paia di anticorpi: anti-*Kell* (K) ed anti-*Cellano* (k), anti-*Penney* (Kp^a) ed anti-*Rautenberg* (Kp^b) ed anti-*Sutter* (Is^a, Is^b). Gli antigeni *Sutter* sono stati finora trovati quasi esclusivamente in negri.

Le sostanze del sistema *Kell* si trovano esclusivamente sugli eritrociti. Esse non si trovano nei secreti e sono pienamente espresse alla nascita.

I fattori del sistema *Kell* sono codominanti e geneticamente indipendenti da tutti gli altri sistemi conosciuti di gruppi sanguigni. Le 3 paia di antigeni vengono controllate da una sola regione cromosomica complessa. A prescindere da rarissime varianti, si tratta qui di 3 paia di geni alleli in 3 *loci* strettamente associati: K e k al *locus Kell*, Kp^a e Kp^b al *locus* Kp e Is^a ed Is^b al *locus* Is.

L'antigene clinicamente più importante è il fattore K. Esso si trova in circa l'8 % della popolazione, prevalentemente in forma eterozigote (Kk). L'antigene *Kell* è un forte immunogeno. Già dopo una trasfusione di sangue si possono trovare anticorpi immuni. Dato che circa il 90 % della popolazione è *Kell*-negativo, è grande la probabilità di immunizzazione in caso di trasfusione di sangue *Kell*-positivo. Anche il carattere *Cellano* (k) possiede notevole immunogenicità. Dato però che solo lo 0,2 %

reazione con				fenotipo	genotipo	frequenza USA (%)
anti-K	anti-k	anti-Kp^a	anti-Kp^b			
+	—	—	+	KK Kp^b Kp^b	K Kp^b/K Kp^b	0,2
+	+	—	+	Kk Kp^b Kp^b	K Kp^b/k Kp^b	9,0
+	+	+	+	Kk Kp^a Kp^b	K Kp^b/k Kp^a oppure K Kp^a/k Kp^b	0,1
—	+	—	+	kk Kp^b Kp^b	k Kp^a/k Kp^b	88,0
—	+	+	+	kk Kp^a Kp^b	k Kp^a/k Kp^b	2,1
—	+	+	—	kk Kp^a Kp^a	k Kp^a/k Kp^a	0,01
—	—	—	—		—/—	0,003

Tabella 9 - Il sistema *Kell* (secondo LEVINE).

reazione con anti-Fy^a	reazione con anti-Fy^b	fenotipo	genotipo	frequenza europea (%)
+	—	Fy (a+b—)	Fy^a Fy^a	19,582
+	+	Fy (a+b+)	Fy^a Fy^b	47,854
—	+	Fy (a—b+)	Fy^b Fy^b	32,564

Tabella 10 - Il sistema *Duffy* (secondo RACE e SANGER).

della popolazione è *Kell*-positivo omozigote (KK) e solo questi possono formare un anti-*Cellano*, la frequenza di questo anticorpo è assai bassa (tab. 9).

L'anti-*Kell* e l'anti-*Cellano* sono sempre anticorpi immuni. Essi hanno un ruolo non irrilevante in incidenti da trasfusione e talora nella malattia emolitica del neonato. La loro ricerca è da farsi regolarmente, con l'ausilio della tecnica dell'antiglobulina indiretta.

7) IL SISTEMA *DUFFY*

Gli antigeni del sistema *Duffy* sono localizzati sulla membrana degli eritrociti, e sono ben sviluppati alla nascita. I recettori possono venire inattivati mediante trattamento con fermenti proteolitici.

Con gli antisieri anti-Fy^a ed anti-Fy^b è possibile evidenziare i fenotipi, i relativi genotipi nonché la loro frequenza nella popolazione (tab. 10).

I fattori Fy^a e Fy^b sono ereditati come 2 geni alleli codominanti. Con il ritrovamento di persone Fy (a—b—) la teoria, che era stata emessa, che il *locus Duffy* abbia 2 soli geni alleli, non è più sostenibile. RACE e SANGER (1968) suppongono perciò l'esistenza di un 3° allele « silente » al *locus Duffy*.

Gli anticorpi del sistema *Duffy* sono sempre anticorpi immuni. Essi vengono evidenziati di preferenza con la tecnica dell'antiglobulina. Talora si possono dimostrare effetti di dose. Dato che anche l'antigene Fy^a è da annoverarsi tra gli immunogeni forti, non è raro evidenziare anticorpi anti-Fy^a dopo trasfusioni di sangue incompatibile. Anticorpi delle specificità Fy^b vengono osservati assai più raramente. Sia anti-Fy^a che anti-Fy^b sono stati descritti come causa di malattia emolitica del neonato. Essi hanno notevole importanza nelle trasfusioni di sangue; di solito vengono riconosciuti, alla prova crociata, solo con il *test* di Coombs indiretto.

8) IL SISTEMA *LUTHERAN*

Con l'ausilio degli antisieri anti-Lu^a ed anti-Lu^b è possibile distinguere i vari fenotipi, i relativi genotipi e la loro frequenza (tab. 11).

La trasmissione ereditaria degli antigeni *Lutheran* avviene secondo le leggi di Mendel. Si suppone che la formazione di questi antigeni venga controllata da un paio di

reazione con anti-Lu^a	reazione con anti-Lu^b	fenotipo	genotipo	frequenza europea (%)
+	—	Lu (a+b—)	Lu^a Lu^a	0,15
+	+	Lu (a+b+)	Lu^a Lu^b	7,50
—	+	Lu (a—b+)	Lu^b Lu^b	92,35

Tabella 11 - Il sistema *Lutheran* (secondo RACE e SANGER).

geni alleli (Lu^a ed Lu^b). Non esiste finora una spiegazione genetica generalmente riconosciuta per i casi, estremamente rari, con il fenotipo Lu (a—b—).

Gli anticorpi *Lutheran* sono rari e si trovano sia come anticorpi « naturali » attivi a freddo sia come anticorpi immuni. La ricerca degli anticorpi *Lutheran* naturali viene fatta di preferenza in soluzione fisiologica, quella degli anticorpi immuni con la tecnica dell'antiglobulina.

9) IL SISTEMA *KIDD*

L'antigene Jk^a venne scoperto nel 1951 con l'ausilio di un anticorpo, che era stato trovato nel sangue della madre di un bambino ammalato di anemia emolitica del neonato. Nel 1953 la presenza dell'antigene allelico Jk^b, che era stata postulata, potè essere provata mediante il corrispondente anticorpo (tab. 12).

A prescindere dalle rarissime eccezioni nelle quali è stata osservata la variante Jk (a—b—), questo sistema dovrebbe essere controllato da 2 geni alleli Jk^a e Jk^b. Gli anticorpi del sistema *Kidd* sono sempre anticorpi immuni ed appartengono prevalentemente alla classe delle globuline IgG. La loro ricerca riesce nel modo migliore con il *test* dell'antiglobulina indiretto. La sensibilità può venire aumentata con l'impiego di cellule trattate con enzimi. Una particolarità degli anticorpi *Kidd* è la loro relativa instabilità, che rende necessaria la conservazione degli antisieri a temperature molto basse o allo stato liofilizzato. Tanto l'anti-Jk^a quanto l'anti-Jk^b possono essere causa di reazioni trasfusionali. Si sono osservate anche malattie emolitiche di neonati quale conseguenza di questi anticorpi.

reazione con anti-Jk^a	reazione con anti-Jk^b	fenotipo	genotipo	frequenza europea (%)
+	—	Jk (a+b—)	Jk^a Jk^a	26,44
+	+	Jk (a+b+)	Jk^a Jk^b	49,96
—	+	Jk (a—b+)	Jk^b Jk^b	23,60

Tabella 12 - Il sistema *Kidd* (secondo RACE e SANGER).

10) FATTORI SANGUIGNI MOLTO FREQUENTI O MOLTO RARI

Oltre agli antigeni dei gruppi sanguigni finora descritti vi è un considerevole numero di altri fattori sanguigni, che non mostrano evidentemente alcuna relazione con uno qualsiasi dei sistemi noti. Gli anticorpi che li definiscono si trovano con estrema rarità, in quanto la probabilità di immunizzazione è molto scarsa ed inoltre alcuni antigeni hanno debole immunogenicità. La scarsa probabilità di immunizzazione è dovuta o al fatto che questi antigeni sono pressoché « ubiquitari » (frequenza superiore al 99 % della popolazione) o al fatto che essi sono assai rari (cosiddetti antigeni « privati », con frequenza inferiore all'1 % della popolazione).

Agli antigeni che si trovano con altissima frequenza appartengono i fattori Vel, Ge (*Gerbich*), Lan, Co^a (*Colton*), Gy^a (*Gregory*) ed At^a (*August*). Antigeni « privati » assai rari sono per esempio i fattori Be^a (*Berrens*), By (*Batty*), Bi (*Biles*), Bx (*Box*), *Evans*, *Good*, *Heibel*, Ht^a (*Hunt*), Jn, etc.

I relativi anticorpi sono stati scoperti per lo più dopo trasfusioni incompatibili, gravidanze o nel siero di pazienti con anemia emolitica immune. Corrispondentemente alla loro bassissima frequenza, è assai scarsa la probabilità che essi siano causa di reazioni trasfusionali o di malattia emolitica del neonato.

Tecniche

GENERALITÀ

A) PREPARAZIONE DEL SANGUE

1) Controllare che le scritte sulle provette inviate con il sangue da esaminare siano complete. Confrontare cognome, nome, data di nascita e dati personali con le schede di accompagnamento;

2) lasciare coagulare completamente il sangue (prelevato senza additivi anticoagulanti). Se necessario, la coagulazione può essere accelerata mediante incubazione a 37 °C. Il sangue con additivi anticoagulanti (citrato, ACD, eparina, EDTA) può essere ugualmente impiegato per determinazioni sierologiche dei gruppi sanguigni. Per la ricerca di anticorpi il plasma è meno adatto, data la possibilità di disturbo delle reazioni sierologiche;

3) centrifugare la provetta con il campione di sangue per circa 3-5 min a 1.500 x *g*. (Accelerazione centrifuga relativa: 1.500 x *g* corrispondono a circa 3.000 giri/min, 800 x *g* a circa 2.000 giri/min e 150 x *g* a circa 1.000 giri/min, in una normale centrifuga da tavolo);

4) trasferire il siero (o rispettivamente il plasma) sopranatante in una provetta vuota, etichettata, mediante pipetta Pasteur.

B) PREPARAZIONE DELLE SOSPENSIONI DI ERITROCITI

Per gli esami sierologici sui gruppi sanguigni si richiedono sospensioni cellulari di varia densità ed in diversi mezzi di sospensione. Il mezzo richiesto per la sospensione (per esempio soluzione fisiologica di cloruro di sodio, sieroalbumina bovina al 20 % o siero autologo) viene mescolato con un volume corrispondente della massa di eritrociti del sedimento cellulare, che rimane dopo la centrifugazione. Le sospensioni più frequentemente impiegate per esami sierologici sui gruppi sanguigni sono una sospensione al 2-5 % di eritrociti in soluzione fisiologica di cloruro di sodio (1 goccia di sedimento di eritrociti + 1-2 ml di soluzione fisiologica), sospensione al 20 % di eritrociti in albumina (5 gocce di sedimento di eritrociti + 20 gocce di sieroalbumina bovina) ed una sospensione al 40-50 % di eritrociti nel proprio siero (o rispettivamente nel proprio plasma), costituita da 1 parte di siero e da 1 parte di sedimento cellulare.

Per certi esami è necessario eliminare completamente il plasma dagli eritrociti. Ciò viene ottenuto lavando gli eritrociti: si mescola il volume di cellule voluto con una quantità circa 10 volte maggiore di soluzione fisiologica di cloruro di sodio in provetta da centrifuga, successivamente si separano gli eritrociti per centrifugazione (3 min a circa 800 x *g*) e si aspira il liquido sopranatante privo di cellule. Successivamente il sedimento cellulare viene riportato in sospensione con un volume 10 volte maggiore di soluzione fisiologica, si mescola accuratamente e si torna a separare per centrifugazione. Dopo aver ripetuto per 3-4 volte questa operazione di lavaggio, il

liquido sopranatante è in larga misura esente da proteine. Si aggiunge il mezzo richiesto per la sospensione, di norma soluzione fisiologica, al sedimento cellulare fino ad ottenere la densità di cellule desiderata.

c) osservazioni generali in relazione alle tecniche

In linea di principio, si distinguono i *tests* su vetrino da quelli in provetta. Entrambi i metodi presentano vantaggi ed inconvenienti.

I metodi su vetrino hanno il vantaggio di essere più semplici, soprattutto per esami di serie; essi richiedono di norma dosi minori di reattivi e sono più facili da annotare. Il loro inconveniente consiste nel pericolo di essiccamento per evaporazione. Inoltre essi sono meno sensibili dei *tests* in provetta.

I metodi in provetta (particolarmente il « metodo per centrifugazione ») sono più sensibili dei *tests* su vetrino; il pericolo di essiccamento è scarso. Inoltre non è più necessario l'impiego di camera umida, né sono richieste le laboriose operazioni di mescolamento. Il loro svantaggio consiste in un'esecuzione più complessa e nel consumo di materiale, che di norma è più elevato.

REAGENTI BEHRING
per la sierologia dei gruppi sanguigni

sistema abo

Siero anti-A

Siero anti-B

Siero anti-A + B (gruppo 0)

Siero anti-A, anti-B, anti-A + B

Siero anti-A, anti-B, anti-A + B, anti-D

Fitoagglutinina anti-A_1

Fitoagglutinina anti-H (A_2)

sistema Rh

Siero anti-C, incompleto

Siero anti-C^w, incompleto

Siero anti-c, incompleto

Siero anti-C + D, incompleto

Siero anti-C + D + E, incompleto

Siero anti-D, incompleto

Siero anti D + E, incompleto

Siero anti-E, incompleto

Siero anti-e, incompleto

Siero anti-C, completo

Siero anti-C^w, completo

Siero anti-c, completo

Siero anti-D, completo

Siero anti-E, completo

Siero anti-e, completo

supplementi

Bromelina (liofilizzata)

Siero AB,
siero di controllo, negativo

Siero di controllo per la sierologia dei Gruppi Sanguigni, positivo

Sieroalbumina bovina, 20%

Sieroalbumina bovina, 30%

sieri per test di Coombs

Siero anti-globuline umane « normale »

Siero anti-globuline umane « forte »

Siero anti-globuline umane « contrasto »

Siero anti-Ig G

Siero anti-C3/C3 c

Siero anti-C4

ISTITUTO BEHRING

SCOPPITO (L'AQUILA)

sospensione di eritrociti-test (Sangocell®)

Sangocell-A_1-Rh positivo

Sangocell-A_2-Rh positivo

Sangocell-B, Rh positivo

Sangocell-O, Rh positivo (CcD.Ee)

Sangocell-O Rh negativo (cc dd ee)

Sangocell A_1, A_2, B e O, Rh positivo

Sangocell-C per il controllo test di Coombs

Sangocell-S, per la ricerca di anticorpi (sospensione I e II)

Sangocell I, per la identificazione di anticorpi (sospensioni da 1 a 11)

Sangocell AC per il controllo dell'attività anticomplementare

altri sistemi eritrocitari

Siero grezzo anti-M (coniglio)

Siero anti-M, completo (coniglio)

Siero anti-M^g, completo

Siero grezzo anti-N (coniglio)

Siero anti-N, completo (coniglio)

Siero anti-S, completo

Siero anti-s incompleto

Siero anti-Cellano(k), incompleto

Siero anti-$Duffy^a$ (Fy^a), incompleto

Siero anti-$Duffy^b$ (Fy^b), incompleto

Siero anti-Kell (K), incompleto

Siero anti-$Kidd^a$ (JK^a), incompleto

Siero anti-$Lewis^a$ (Le^a), completo

Siero anti-$Lewis^b$ (Le^b), completo

Siero anti-$Lutheran^a$ (Lu^a), incompleto liofilizzato

Siero anti-P_1, completo

Anti-Tj^a ($P+P_1+P^k$), liofilizzato

ISTITUTO BEHRING

SCOPPITO (L'AQUILA)

Tecniche della sierologia dei gruppi sanguigni

GENERALITÀ SULLA DETERMINAZIONE DEI GRUPPI SANGUIGNI

Per l'identificazione di uno dei due partecipanti ad una semplice reazione immunologica del tipo antigene-anticorpo devono essere noti o i rispettivi antigeni o gli anticorpi specifici (sieri-*test* per gruppi sanguigni). Per determinare un gruppo sanguigno è necessario un antisiero noto. Viceversa, con eritrociti-*test* noti è possibile evidenziare anticorpi di specificità incognita.

Nella sierologia dei gruppi sanguigni trovano applicazione soprattutto semplici reazioni di agglutinazione. A seconda del tipo degli antigeni o rispettivamente degli anticorpi che prendono parte alla reazione, si fanno variare la temperatura ed il mezzo di incubazione. Con l'aggiunta di fermenti proteolitici (bromelina, tripsina, papaina, ficina) è possibile, in certi casi, aumentare nettamente la sensibilità della reazione. Per risolvere certi problemi si ricorre alla tecnica di Coombs, che permette di evidenziare anticorpi non agglutinanti. Le emolisine, cioè anticorpi con attività emolitica, vengono evidenziate per la loro capacità di distruggere gli eritrociti in presenza di complemento.

TECNICA 1 - Test *di agglutinazione in provetta (metodo per centrifugazione in provetta) con impiego di sospensione al 2-5 % di eritrociti in soluzione fisiologica.*

1) In una provetta per agglutinazione (65 x 100 mm) mettere 1 goccia di antisiero conglutinante ed 1 goccia della sospensione di eritrociti incognita, quindi agitare;

2) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

3) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare con illuminazione per trasparenza (agglutinoscopio) inclinando e ruotando la provetta per stabilire l'agglutinazione.

Esempio di applicazione: determinazione del fattore Rh con siero-*test* Rh conglutinante.

Controlli: *a*) invece dei globuli rossi incogniti si usano eritrociti-*test* noti con e senza l'antigene da determinare (per esempio eritrociti Rh-positivo e Rh-negativo di gruppo 0); *b*) sieroalbumina bovina in luogo del siero-*test* Rh.

TECNICA 2 - Test *di agglutinazione su vetrino con sospensione al 40-50 % di eritrociti in siero o plasma del soggetto in esame.*

1) Mescolare 2 gocce del siero-*test* con 1 goccia di sospensione di eritrociti al 40-50 % sulla superficie di un vetrino portaoggetti o nel pozzetto di un vetrino (vetrino a pozzetti);

2) incubare per 60 min a 37 °C in camera umida;

3) esaminare l'agglutinazione inclinando e ruotando il vetrino.

Esempio di applicazione: determinazione dei fattori Rh con sieri-*test* Rh conglutinanti.

Controlli: come per la tecnica 1.

VARIAZIONE:

sospensione di eritrociti al 40-50 %; temperatura di incubazione 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 1 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei gruppi sanguigni AB0.

TECNICA 3 - Test *rapido a caldo su vetrino portaoggetti con sospensione al 40-50 % di eritrociti in siero o plasma del soggetto in esame.*

Osservazione preliminare: con l'impiego di elevate temperature (40-50 °C) è possibile accelerare con sieri immuni particolarmente potenti lo svolgimento della reazione, tanto che una lettura del *test* può essere fatta dopo appena 1-2 min. Per il *test* rapido a caldo è perciò necessaria una lastra di vetro opaco riscaldata (agglutinoscopio per Rh).

1) Su un vetrino portaoggetti mescolare 1 goccia di siero-*test* e 2 gocce della sospensione di eritrociti, distendendo quindi fino al diametro di 2 cm circa;

2) porre il vetrino portaoggetti sul piano luminoso previamente riscaldato (agglutinoscopio); temperatura del vetro necessaria: 40-50 °C;

3) oscillare l'agglutinoscopio per 2 min esatti; leggere quindi l'agglutinazione.

Esempio di applicazione: determinazione dei fattori Rh con sieri-*test* conglutinanti, soprattutto con anti-D.

Controlli: come per la tecnica 1.

TECNICA 4 - Test *di agglutinazione in provetta con sospensione al 2-5 % di eritrociti in soluzione di cloruro di sodio allo 0,85 % (soluzione fisiologica).*

1) Mettere nella provetta per agglutinazione 1 goccia del siero-*test* agglutinante ed 1 goccia di sospensione di eritrociti al 2-5 %; agitare brevemente;

2) incubare per il tempo e con la temperatura di volta in volta ottimali;

3) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

4) scuotere il sedimento con precauzione, esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza inclinando e ruotando lentamente la provetta.

VARIAZIONE I:

sospensione di eritrociti al 2 %; temperatura di incubazione 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 10 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei gruppi sanguigni AB0.

VARIAZIONE II:

sospensione di eritrociti al 5 %; temperatura di incubazione 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 5 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei gruppi sanguigni AB0.

VARIAZIONE III:

sospensione di eritrociti al 5 %; temperatura di incubazione 37 °C; tempo di incubazione 30 min (bagnomaria) o 60 min (termostato).

Esempio di applicazione: determinazione dei fattori Rh con sieri-*test* agglutinanti.

VARIAZIONE IV:

sospensione di eritrociti al 2 %; temperatura di incubazione 37 °C; tempo di incubazione 30 min (bagnomaria) o 60 min (termostato).

Esempio di applicazione: determinazione del fattore S con siero-*test* agglutinante.

VARIAZIONE V:

sospensione di eritrociti al 2 %; temperatura di incubazione 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 30 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei fattori Le^a, Le^b, P_1 con sieri-*test* agglutinanti.

Controlli: eritrociti-*test* noti, con e senza l'antigene da determinare.

TECNICA 5 - Test *di agglutinazione su vetrino con sospensione al 2-5 % di eritrociti in soluzione di cloruro di sodio allo 0,85 %.*

1) Mescolare 1 goccia del siero-*test* agglutinante ed 1 goccia della sospensione di eritrociti su un portaoggetti o nel pozzetto di un vetrino;

2) incubare in camera umida per il tempo e con la temperatura di volta in volta ottimali;

3) inclinando e ruotando lentamente il portaoggetti, esaminare l'agglutinazione.

VARIAZIONE I:

sospensione di eritrociti al 5 %; temperatura di incubazione a 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 10 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei gruppi sanguigni AB0.

VARIAZIONE II:

sospensione di eritrociti al 5 %; temperatura di incubazione 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 5 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei sottogruppi A_1 ed A_2 del gruppo A con fitoagglutinine.

VARIAZIONE III:

sospensione di eritrociti al 5 %; temperatura di incubazione 37 °C; tempo di incubazione 60 min (termostato).

Esempio di applicazione: determinazione dei fattori Rh con sieri-*test* agglutinanti.

VARIAZIONE IV:

sospensione di eritrociti al 2 %; temperatura di incubazione 20 °C (temperatura ambiente); tempo di incubazione 30 min.

Esempio di applicazione: determinazione dei fattori M, N e P_1.

IL *TEST* DELL'ANTIGLOBULINA (*TEST* DI COOMBS)

Principio: questo *test*, descritto per la prima volta nel 1906 da MORESCHI e riscoperto nel 1945 da COOMBS, MOURANT e RACE, evidenzia le globuline non agglutinanti sulla superficie degli eritrociti. Esso consiste in 2 reazioni antigene-anticorpo specifiche.

PRIMA FASE (FASE DI SENSIBILIZZAZIONE)

Gli anticorpi non agglutinanti, specifici per i recettori della membrana eritrocitaria, si combinano con il loro antigene. Si può qui trattare di isoanticorpi specifici per il gruppo sanguigno (per esempio contro i fattori sanguigni *Kell*, *Duffy*, *Kidd*, etc.) o di autoanticorpi a caldo incompleti. Questi anticorpi incompleti appartengono prevalentemente alla classe delle globuline IgG. Vengono però trovati anche anticorpi delle classi IgA e/o IgM. Talora si fissano alla membrana degli eritrociti anche globuline del sistema del complemento (soprattutto della componente C4 e C3). La « sensibilizzazione » può prodursi *in vivo* quale conseguenza di incompatibilità materno-fetale (malattia emolitica del neonato), di non corretta trasfusione o di anemia emolitica autoimmune (*test* di Coombs diretto positivo).

Quando invece la « sensibilizzazione » viene ottenuta *in vitro* per incubazione di eritrociti-*test* con isoanticorpi incompleti o con autoanticorpi, si parla di *test* dell'antiglobulina o di Coombs indiretto.

Dopo la fase di sensibilizzazione si eliminano dalla superficie degli eritrociti, mediante lavaggio più volte ripetuto, tutte le proteine non saldamente fissate. Solo le globuline immunologicamente legate restano fissate sugli eritrociti.

SECONDA FASE (FASE DELL'ANTIGLOBULINA)

Se agli eritrociti lavati e « sensibilizzati », cioè caricati con anticorpi (= immunoglobuline) si aggiunge un antisiero contro le globuline umane ricavato da animale immunizzato, gli anticorpi del siero antiglobulina, che si oppongono alle globuline umane, si legano in modo specifico con le globuline fissate sugli eritrociti. Ciò rende possibile il collegamento di diversi eritrociti in un agglutinato macroscopicamente

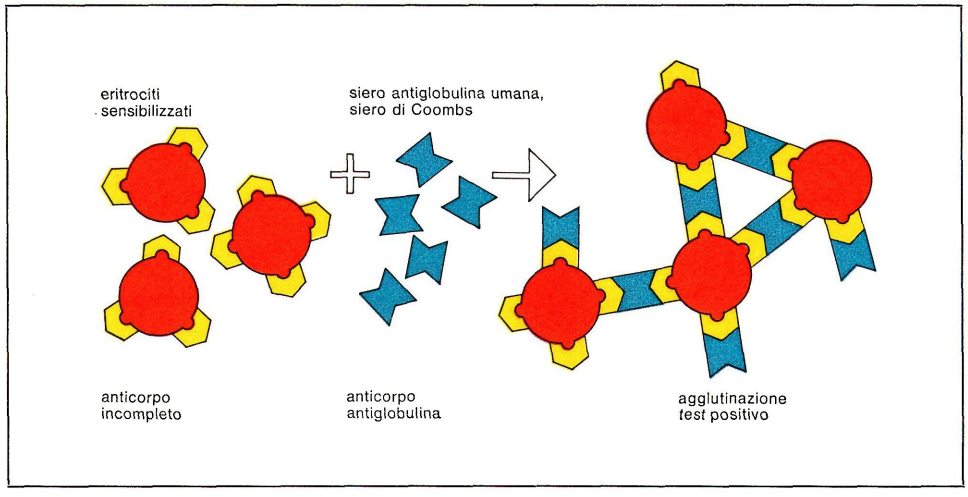


Fig. 7 - Rappresentazione schematica del *test* di Coombs diretto.

visibile. Anche questo collegamento costituisce una reazione immunologica specifica, ma non tra eritrocita ed anticorpo, bensì tra l'immunoglobulina fissata sugli eritrociti e gli anticorpi antiglobulina. Questo significa che il siero antiglobulina reagisce con tutti gli anticorpi fissati sugli eritrociti, indifferentemente che si tratti di anti-*Kell*, di anti-D o di autoanticorpo incompleto.

TECNICA 6 - *Il* test *dell'antiglobulina (di Coombs) diretto in provetta.*

1) Mettere in una provetta circa 5-10 gocce di sospensione densa di eritrociti del paziente in un siero o plasma del paziente stesso. Lavare per 3-4 volte con soluzione fisiologica di cloruro di sodio (v. pag. 29);

2) dopo l'ultima aspirazione del liquido sopranatante preparare una sospensione degli eritrociti al 2-5 % circa con nuova aggiunta di soluzione fisiologica;

3) mettere 2 gocce di questa sospensione di eritrociti e 2 gocce del siero antiglobulina umana « normale » in una provetta per agglutinazione, agitare e lasciar riposare per 3 min a temperatura ambiente;

4) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

5) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza, inclinando e ruotando la provetta.

TECNICA 7 - *Il* test *dell'antiglobulina (di Coombs) diretto su vetrino.*

1) Mettere in una provetta circa 5-10 gocce di sospensione densa di eritrociti del paziente in un siero o plasma del paziente stesso. Lavare per 3-4 volte con soluzione fisiologica (v. pag. 29);

2) dopo l'ultima aspirazione, preparare con il sedimento di eritrociti una sospensione al 30 % circa di eritrociti in soluzione fisiologica;

3) su un portaoggetti (vetrino a pozzetti) mescolare 1 goccia della sospensione di eritrociti al 30 % ed 1 goccia del siero antiglobulina, indi lasciar riposare per 5 min a temperatura ambiente;

4) inclinando e ruotando il vetrino, esaminare l'agglutinazione.

Controlli: quali controlli positivi si impiegano eritrociti Rh-positivo del gruppo 0, ricoperti con anticorpi anti-D incompleti, in sospensione al 5 % (*Sangocell*®-C, eritrociti per il controllo del *test* di Coombs). Come controllo negativo serve una sospensione al 5 % di cellule Rh-negativo del gruppo 0 lavate per 3 volte.

Esempio di applicazione: esame di eritrociti di bambini con sospetta malattia emolitica del neonato, in caso di incidenti da trasfusione e di anemie emolitiche autoimmuni.

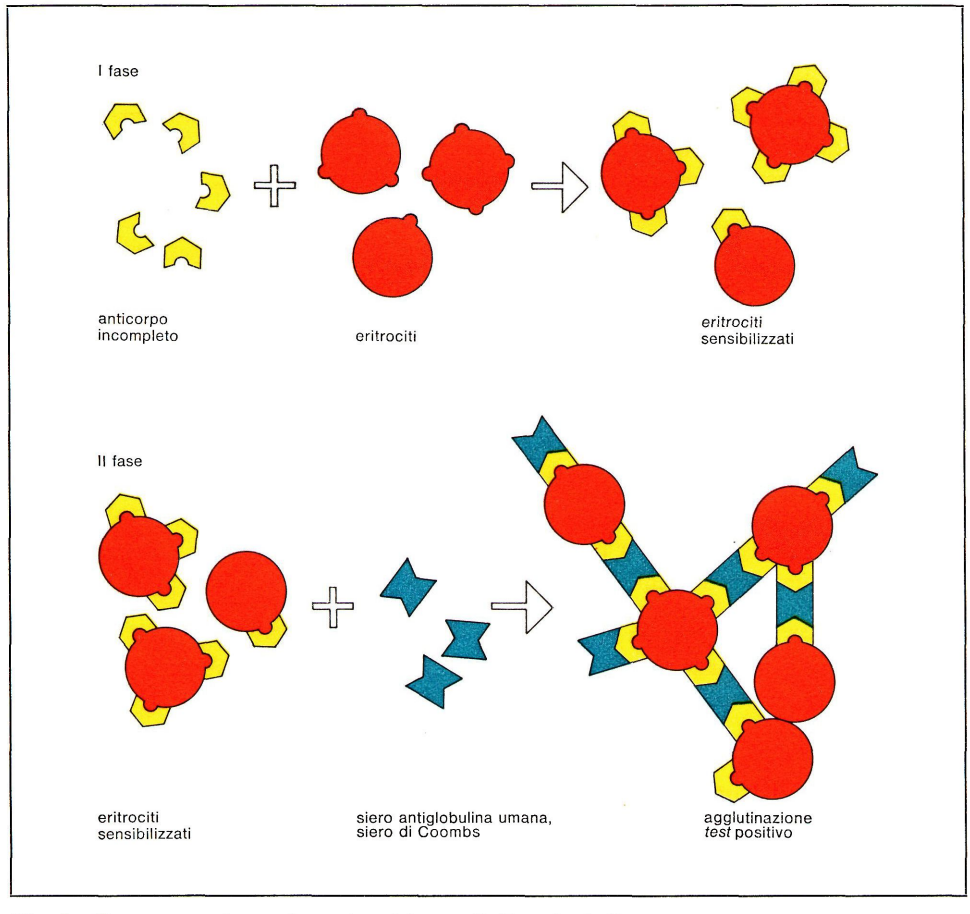


Fig. 8 - Rappresentazione schematica del *test* di Coombs indiretto.

TECNICA 8 - *Il* test *dell'antiglobulina (di Coombs) indiretto in provetta.*

1) Lavare gli eritrociti-*test* (eritrociti con lo spettro antigenico necessario per l'esame in questione) per 1-2 volte in soluzione fisiologica (v. pag. 29);

2) dal sedimento preparare una sospensione di eritrociti al 2-5 % circa in soluzione fisiologica;

3) in una provetta per agglutinazione mettere 0,1 ml della sospensione al 2-5 % di eritrociti-*test* e 0,1 ml di antisiero specifico (per esempio anti-*Kell* o anti-Fy^a) ed incubare per 30 min a bagnomaria o per 60 min in termostato a 37 °C (sensibilizzazione);

4) dopo l'incubazione lavare per 3-4 volte le emazie con soluzione fisiologica;

5) dopo l'ultima operazione di lavaggio aggiungere al sedimento di eritrociti 2 gocce del siero antiglobulina umana « normale », agitare e lasciar riposare per 3 min a temperatura ambiente;

6) centrifugare brevemente a 150 x *g*;

7) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione inclinando e ruotando la provetta, con illuminazione per trasparenza.

TECNICA 9 - *Il* test *dell'antiglobulina (di Coombs) indiretto su vetrino.*

1) Lavare gli eritrociti-*test* (eritrociti con lo spettro antigenico necessario per l'esame in questione) per 1-2 volte in soluzione fisiologica (v. pag. 29);

2) dal sedimento preparare una sospensione al 2-5 % circa di eritrociti in soluzione fisiologica;

3) in una provetta per agglutinazione mettere 0,1 ml della sospensione al 2-5 % di eritrociti-*test* e 0,1 ml di antisiero specifico (per esempio anti-*Kell* o anti-Fy^a) ed incubare per 30 min a bagnomaria o per 60 min in termostato a 37 °C (sensibilizzazione);

4) dopo l'incubazione lavare il contenuto della provetta con soluzione fisiologica per 3-4 volte;

5) dopo l'ultima operazione di lavaggio preparare dal sedimento di eritrociti una sospensione al 30 % circa in soluzione fisiologica;

6) sul portaoggetti (vetrino a pozzetti) mescolare 1 goccia della sospensione al 30 % di eritrociti-*test* sensibilizzati e 2 gocce di siero antiglobulina umana « normale »;

7) lasciar riposare per 5 min a temperatura ambiente;

8) inclinando e ruotando il vetrino, esaminare l'agglutinazione.

Controllo positivo: *Sangocell®-C*, eritrociti-*test* per il controllo del *test* di Coombs.

Controllo negativo: eritrociti-*test* Rh-negativo del gruppo 0 non sensibilizzati (*Sangocell®*).

Esempio di applicazione: determinazione dei gruppi sanguigni *Kell*, *Duffy*, *Kidd*, s, D^u ed altri. Ricerca nel siero di anticorpi incompleti attivi nel *test* di Coombs.

TECNICA 10 - *Determinazione del titolo di antiglobulina.*

In caso di esito positivo della reazione, può essere interessante una valutazione quantitativa del grado di « sensibilizzazione » (per esempio in caso di *test* dell'antiglobulina diretto positivo sul sangue del cordone ombelicale di neonato) o della forza di un anticorpo evidenziato nel *test* dell'antiglobulina indiretto (per esempio in un paziente cui siano state praticate più trasfusioni o in una donna gravida). Questa valutazione è possibile mediante la determinazione del titolo di una serie di diluizioni del siero antiglobulina o rispettivamente del siero del paziente.

VARIAZIONE I: *titolo del* test *dell'antiglobulina diretto.*

1) Dal campione di sangue positivo al *test* di Coombs diretto si prepara il più accuratamente possibile una sospensione di eritrociti al 5 % in soluzione fisiologica;

2) preparare una serie di diluizioni in progressione geometrica con 0,1 ml del siero antiglobulina umana in soluzione fisiologica e mettere 0,05 ml delle varie diluizioni in altrettante provette per agglutinazione;

3) in ogni provetta aggiungere esattamente 0,05 ml della sospensione di eritrociti al 5 %;

4) lasciar riposare il contenuto delle provette per 3 min esatti a temperatura ambiente, quindi centrifugare brevemente a 150 x *g*. Raccogliere il sedimento scuotendo con precauzione ed eseguire la lettura quantitativa secondo la tab. 13, ruotando ed inclinando le provette con illuminazione per trasparenza.

Quale stadio finale del titolo viene indicata la reazione (+). Prendendo in considerazione il valore numerico, si ha un elemento in più per valutare la forza dell'agglutinazione.

VARIAZIONE II: *titolo del* test *dell'antiglobulina indiretto.*

1) Preparare una serie di diluizioni in progressione geometrica del siero in esame in soluzione fisiologica;

simboli	forma dell'agglutinato	valore numerico
++++	un grosso agglutinato, che difficilmente si stacca per scuotimento	10
+++	diversi grossi agglutinati	8
++	agglutinati grossi e piccoli	5
+	agglutinati piccoli, poche cellule non agglutinate	3
(+)	agglutinati piccoli, che si staccano per scuotimento, e cellule non agglutinate	1
—	nessun agglutinato	0

Tabella 13.

2) preparare 8 provette per agglutinazione e numerarle progressivamente. In ciascuna provetta mettere 0,05 ml delle rispettive diluizioni;

3) in ciascuna provetta aggiungere 0,05 ml di una sospensione al 5 % di eritrociti-*test* (a reazione positiva) in soluzione fisiologica;

4) agitare il contenuto delle provette; incubare per 30 min a 37 °C a bagnomaria;

5) lavare il contenuto di tutte le provette per 3-4 volte con abbondante soluzione fisiologica;

6) dopo l'ultima operazione di lavaggio togliere completamente il liquido sopranatante con una pipetta (o versarlo ed assorbire le ultime gocce con carta bibula);

7) in ciascuna provetta mettere 0,1 ml di siero antiglobulina umana « normale », agitare e lasciar riposare per 3 min a temperatura ambiente;

8) centrifugare brevemente il contenuto delle provette a 150 x *g* ed esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza.

FONTI DI ERRORE NEL TEST DELL'ANTIGLOBULINA

Reazioni positive false

1) Agglutinazione diretta degli eritrociti-*test* durante la fase di « sensibilizzazione » nel *test* dell'antiglobulina indiretto. Il siero impiegato contiene anticorpi completi, che reagiscono già in soluzione fisiologica. Essi si possono riconoscere ad una lettura intermedia, eseguita dopo la prima operazione di lavaggio;

2) reattivi resi impuri da contaminazione batterica, errata concentrazione della soluzione di cloruro di sodio, etc.;

3) formazione di « pile di monete » o « impilamento delle emazie » per essiccamento della miscela di reazione;

4) centrifugazione troppo drastica nel *test* in provetta (riconoscibile per confronto con il controllo negativo);

5) agglutinazione degli eritrociti in presenza di autoanticorpi o di disglobulinemia;

6) apparente presenza di anticorpi nel siero dovuta all'impiego di cellule già sensibilizzate *in vivo*; riconoscibile mediante *test* dell'antiglobulina diretto positivo;

7) massiccia presenza di reticolociti (eseguire un maggior numero di « lavaggi »).

Reazioni negative false

1) Inattivazione del siero antiglobulina da parte di resti del siero presenti sugli eritrociti non lavati a sufficienza;

2) siero antiglobulina inattivato per invecchiamento o per contaminazione batterica;

3) « fenomeno di prozona » del siero antiglobulina. Per « fenomeno di prozona » si intende quel fenomeno per cui, a seguito di relazioni quantitativamente sfavorevoli tra antigeni ed anticorpi, un siero non diluito dà reazioni negative o solo debolmente positive, mentre dà reazioni nettamente positive con diluizioni superiori.

Tale « fenomeno di prozona » si osserva soprattutto con i forti sieri antiglobulina. Conseguentemente, con i sieri antiglobulina non conosciuti si dovrebbe eseguire prima una prova preliminare con eritrociti-*test* sensibilizzati, al fine di stabilire la diluizione più favorevole da usare.

RICERCA DI ANTICORPI

Per tutte le determinazioni di anticorpi sono necessari eritrociti-*test* aventi determinati antigeni. A seconda della specificità dell'anticorpo che si sospetta o si cerca, gli eritrociti-*test* avranno composizione diversa. Per la semplice ricerca degli anticorpi sono di norma sufficienti eritrociti-*test* dei diversi gruppi AB0 (per la determinazione delle isoagglutinine o isoemolisine naturali - *Sangocell®*) nonché eritrociti del gruppo 0 con spettro per quanto possibile ampio di antigeni non appartenenti al sistema AB0 (*Sangocell®-S*, eritrociti-*test* per la ricerca di anticorpi). In caso di reperto positivo degli anticorpi, può essere necessario, per identificare la specificità degli anticorpi in casi difficili (per esempio in presenza di miscugli di anticorpi), ricorrere ad un grande numero di cellule-*test* (*Sangocell®-I*) nonché a tecniche di adsorbimento e di eluizione.

TECNICA 11 - *Determinazione su vetrino delle isoagglutinine nel siero (controprova sul siero).*

1) Impiegare eritrociti-*test* già pronti per l'uso (*Sangocell®*) oppure lavare eritrociti-*test* freschi dei gruppi sanguigni A_1, A_2, B e 0 una volta in soluzione fisiologica e sospenderli al 5 % in soluzione fisiologica;

2) mettere 1 goccia del siero in esame in 4 pozzetti di un vetrino;

3) mettere nel primo pozzetto 1 goccia di cellule A_1, nel secondo 1 goccia di cellule A_2, nel terzo 1 goccia di cellule B e nel quarto 1 goccia di cellule 0. Mescolare con bacchette di legno;

4) lasciar riposare per 10-15 min a temperatura ambiente;

5) inclinando e ruotando il vetrino, esaminare l'agglutinazione.

TECNICA 12 - *Determinazione in provetta delle isoagglutinine.*

1) Contrassegnare 4 provette con le scritte A_1, A_2, B e 0;

2) mettere in ciascuna provetta 1 goccia del siero da esaminare;

3) aggiungere nella prima provetta 1 goccia di sospensione di eritrociti A_1-*Sangocell®*, nella seconda provetta 1 goccia di sospensione di eritrociti A_2-*Sangocell®*, nella terza provetta 1 goccia di sospensione di eritrociti B-*Sangocell®* e nella quarta provetta 1 goccia di sospensione di eritrociti 0-*Sangocell®*;

4) lasciar riposare per 15 min a temperatura ambiente;

5) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

6) scuotere il sedimento con precauzione. Inclinando e ruotando la provetta, esaminare l'agglutinazione.

Esempi di applicazione per le tecniche 11 e 12: determinazione di isoagglutinine nel siero; determinazione di anticorpi irregolari A_1, etc.

TECNICA 13 - *Determinazione del titolo di isoagglutinina.*

1) Preparare e contrassegnare circa 8-10 provette per agglutinazione;

2) in ciascuna provetta mettere 0,1 ml di soluzione fisiologica;

3) mettere nella prima provetta 0,1 ml di siero in esame inattivato (mediante riscaldamento a 56 °C per 30 min). Preparare una serie di diluizioni in progressione geometrica servendosi di una pipetta;

4) in ciascuna provetta aggiungere 0,05 ml di una sospensione al 5 % di eritrociti-*test* (*Sangocell*®). Per persone del gruppo sanguigno A si impiegano cellule B, per persone del gruppo B, cellule A_1, per persone del gruppo 0, cellule A_1 e B. In quest'ultimo caso si devono preparare 2 serie di diluizioni del siero;

5) lasciar riposare per 30 min a temperatura ambiente;

6) centrifugare brevemente tutte le provette a 150 x *g*;

7) scuotere il sedimento con precauzione indi, ruotando ed inclinando la provetta, esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza.

Quale titolo di isoagglutinina viene indicato il valore reciproco di quella diluizione del siero che ancora presenta debole ma pur sempre netta agglutinazione.

TECNICA 14 - *Determinazione di isoemolisine.*

Le emolisine sono anticorpi immuni che, con la partecipazione di complemento, provocano la lisi degli eritrociti. Presupposto per la loro ricerca è la presenza di complemento attivo. La ricerca delle isoemolisine deve perciò essere fatta con siero da esaminare per quanto possibile fresco, conservato per non oltre 48 h a 4 °C oppure, meglio, con l'aggiunta di siero fresco AB umano.

1) In 3 provette per agglutinazione mettere 0,2 ml (4 gocce) di siero fresco oppure 0,1 ml (2 gocce) di siero e 0,1 ml (2 gocce) di siero AB fresco;

2) aggiungere nella prima provetta 0,05 ml (1 goccia) della sospensione al 5 % di eritrociti-*test* (A_1-*Sangocell*®), nella seconda provetta 0,05 ml (1 goccia) di cellule B e nella terza 0,05 ml (1 goccia) di cellule 0. Agitare;

3) incubare tutte le provette per 30 min a 37 °C a bagnomaria o per 60 min in termostato;

4) centrifugare brevemente a 150 x *g* e, senza scuotere, esaminare il liquido sopranatante per constatare l'emolisi. L'emolisi deve comparire solo nella provetta con cellule A_1 o B. Poiché le isoemolisine non agiscono contro gli eritrociti di gruppo 0, la terza provetta serve come controllo negativo.

TECNICA 15 - *Determinazione del titolo di isoemolisina.*

In caso di esito positivo nella ricerca delle isoemolisine (tecnica 14), è possibile una determinazione semiquantitativa della forza degli anticorpi per titolazione.

1) Inattivare il siero del soggetto da esaminare (mediante riscaldamento a 56 °C per 30 min);

2) numerare progressivamente 6 provette per agglutinazione. Mettere in ciascuna provetta 0,1 ml di siero AB fresco;

3) nella prima provetta aggiungere 0,1 ml di siero inattivato, mescolare bene e, servendosi della pipetta, preparare una serie di diluizioni in progressione geometrica (da 1:2 a 1:64), partendo ogni volta da 0,1 ml della diluizione del siero;

4) in ciascuna provetta aggiungere 0,05 ml della sospensione al 5 % di quegli eritrociti-*test* che alla semplice ricerca dell'emolisina hanno dato reazione positiva. Agitare bene;

5) incubare tutte le provette per 30 min a 37 °C a bagnomaria;

6) centrifugare brevemente a 150 x *g*. Esaminare l'emolisi sul liquido sopranatante senza scuotere.

Quale titolo vale il valore reciproco della diluizione alla quale si può ancora riconoscere una emolisi minima.

Esempi di applicazione per le tecniche 13, 14 e 15: eritroblastosi dovuta ad incompatibilità per il sistema AB0, incidenti da trasfusione, ricerca di sangue « esente da emolisine » per trasfusione.

Fonti di errore: reazioni positive false in presenza di emolisine di altre specificità. Eseguire un controllo con eritrociti di gruppo 0.

Autoemolisine nelle anemie emolitiche autoimmuni. Effettuare contemporaneamente un controllo con le cellule proprie del soggetto in esame.

Reazione negativa falsa in presenza di complemento inattivo. Effettuare contemporaneamente il controllo con siero positivo per le emolisine.

TEST DI RICERCA DEGLI ANTICORPI

Il *test* di ricerca degli anticorpi serve per constatare la presenza di anticorpi irregolari in un siero incognito. Poiché, data la molteplicità degli anticorpi, non esiste un *test* che sia in grado di evidenziare tutti gli anticorpi contemporaneamente, è necessario combinare procedimenti di ricerca diversi, in modo da poter determinare uno spettro per quanto possibile largo di specificità e di varianti fisiologiche degli anticorpi. Ciò può essere ottenuto eseguendo i diversi passaggi della reazione con gli eritrociti-*test* l'uno dopo l'altro o l'uno parallelamente all'altro. Gli eritrociti-*test* da impiegare devono portare la maggior parte degli antigeni dei gruppi sanguigni oggi noti. Gli eritrociti *Sangocell*®*-S*, per il *test* di ricerca degli anticorpi, vengono ricavati da 2 donatori di gruppo 0 per escludere incompatibilità AB0 e portano i seguenti caratteri di gruppo sanguigno: D, C, E, c, e, K, k, M, N, S, s, P_1, Tj(a), Le(a), Le(b), Fy(a), Fy(b), Jk(a), Jk(b), Xg(a), Lu(b), Kp(b), H, I ed altri caratteri eritrocitari largamente diffusi.

Il *Sangocell®-S* è costituito da 2 sospensioni al 5 % in speciale soluzione contenente stabilizzatore. Queste sospensioni hanno validità di 7 settimane, a partire dal giorno della loro preparazione.

TECNICA 16 - « Test *in 3 fasi* » *in provetta (soluzione fisiologica, albumina, Coombs).*

1ª FASE: *ambiente salino di NaCl a temperatura ambiente.*

1) Per ogni siero da esaminare contrassegnare 2 provette per agglutinazione con I e II;

2) in ciascuna delle provette I e II mettere 2 gocce di siero;

3) aggiungere nella provetta I 1 goccia della sospensione I di eritrociti al 5 %, nella provetta II 1 goccia della sospensione II di eritrociti al 5 %. Agitare il contenuto delle provette;

4) incubare entrambe le provette per 10 min a temperatura ambiente (max 25 °C);

5) centrifugare brevemente a 150 x *g*;

6) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione su fondo chiaro.

2ª FASE: *ambiente di albumina bovina a 37 °C.*

7) In ciascuna delle 2 provette I e II mettere 2 gocce di sieroalbumina bovina al 30 %;

8) agitare il contenuto delle provette ed incubare per 30 min a 37 °C a bagnomaria (o per 60 min in termostato);

9) centrifugare brevemente a 150 x *g*;

10) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione su fondo chiaro.

3ª FASE: *fase dell'antiglobulina.*

11) Riempire le provette I e II con soluzione fisiologica 0,85 %, riportare accuratamente in sospensione il sedimento di eritrociti e lavare per 3 volte con abbondante soluzione fisiologica (v. pag. 29);

12) dopo l'ultima centrifugazione, aspirare in larga misura il liquido sopranatante, mettere in ciascuna delle 2 provette 2 gocce di siero antiglobulina umana « normale ». Agitare il contenuto delle provette;

13) lasciar riposare le 2 provette per 5 min a temperatura ambiente, quindi centrifugare brevemente a 150 x *g*;

14) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione contro fondo chiaro.

Vantaggi: elevata sensibilità, minor consumo di materiale.

Inconvenienti: laborioso. Per le fasi 1ª e 2ª non è più possibile una contro-lettura da parte di un secondo ricercatore.

TECNICA 17 - « Test *in 3 ambienti* » *(soluzione fisiologica, enzima, Coombs).*

Questo *test* si distingue dalla tecnica 16 per il fatto che ogni fase viene eseguita da sola e che invece dell'ambiente di albumina si ha una fase enzimatica. Per quasi tutti gli anticorpi dei gruppi sanguigni si ottiene, con la tecnica enzimatica, potenziamento della reazione. Solo gli anticorpi dei sistemi MNSs e *Duffy* non si evidenziano con questa tecnica, in quanto questi antigeni vengono distrutti dai fermenti proteolitici. La fermentazione degli eritrociti può essere effettuata con l'aggiunta della soluzione di bromelina (*Istituto Behring*) direttamente durante la reazione sul portaoggetti o nella provetta per agglutinazione. Gli eritrociti-*test* che vengono impiegati sono gli stessi di cui alla tecnica 16. La fase in soluzione fisiologica e quella enzimatica possono essere eseguite su vetrino a pozzetti, il *test* di Coombs deve venir eseguito in provetta.

Test *combinato su vetrino (cloruro di sodio, enzima).*

1) In ciascuno dei 4 pozzetti di un vetrino mettere 1 goccia di siero in esame;

2) in ciascun pozzetto 1 e 2 aggiungere 1 goccia di soluzione di bromelina;

3) mettere in ciascuno dei pozzetti 1 e 3 1 goccia della sospensione I di eritrociti, nei pozzetti 2 e 4, 1 goccia della sospensione II;

4) mescolare con bacchette di legno;

5) incubare in camera umida per 15 min a temperatura ambiente;

6) inclinando e ruotando il vetrino, eseguire la lettura dell'agglutinazione.

Test *dell'antiglobulina umana in provetta.*

1) Per ogni siero da esaminare contrassegnare 2 provette con I e II;

2) in ciascuna delle provette I e II mettere 2 gocce di siero in esame;

3) mettere nella provetta I 1 goccia della sospensione I di eritrociti al 5 %, nella provetta II 1 goccia della sospensione II di eritrociti al 5 %;

4) incubare le 2 provette per 30 min a 37 °C a bagnomaria (o per 60 min in termostato);

5) riempire le provette con soluzione fisiologica 0,85 %, separare le cellule per centrifugazione (3 min a 800 x *g*), versare od aspirare completamente il liquido sopranatante;

6) lavare il sedimento cellulare ancora per 3 volte con soluzione fisiologica;

7) dopo l'ultima centrifugazione, aspirare in larga misura il liquido sopranatante e mettere in ciascuna delle 2 provette 2 gocce di siero antiglobulina umana « normale ». Agitare il contenuto delle provette;

8) lasciar riposare entrambe le provette per 5 min a temperatura ambiente, quindi centrifugare brevemente a 150 x *g*;

9) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione su fondo chiaro.

Vantaggi: grande sensibilità grazie alla fase enzimatica, soprattutto per anticorpi del sistema Rh. Particolarmente adatto per esami in serie.

Inconvenienti: minore sensibilità della fase in soluzione fisiologica rispetto alla fase 1ª della tecnica 16. Possibilità di disturbi per le aspecificità della fase in bromelina.

TECNICA 18 - *Identificazione di anticorpi.*

Non è possibile dare un'indicazione schematica circa il modo di effettuare questo esame. Tutti i metodi di identificazione (constatazione della o delle specificità degli anticorpi contenuti in un siero) sono basati sul principio di far reagire in ambienti diversi e con temperature di incubazione differenti il siero in esame con un numero vario di eritrociti-*test*, che siano per quanto possibile esattamente noti in relazione ai più importanti gruppi sanguigni e si integrino nel loro spettro antigenico. Dallo spettro di reazione noto per ogni antigene è possibile, in certi casi, risalire alla specificità dell'anticorpo. In molti casi, soprattutto con i miscugli di anticorpi, sono tuttavia necessari metodi diversi, come quelli per adsorbimento e per eluizione. Questi vanno eseguiti presso un laboratorio specializzato.

Per gli anticorpi semplici è sufficiente la reazione con *Sangocell®-I*, eritrociti-*test* per la identificazione di anticorpi. Con essi si possono individuare anticorpi irregolari contro i seguenti antigeni eritrocitari: D, C, E, c, e, C^w, K, M, N, S, s, P_1, Kp^a, Lu^a, Le^a, Le^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b e Xg^a.

Il *Sangocell®-I* è costituito da eritrociti sterili, sospesi al 5 % in speciale soluzione con stabilizzatore.

METODO PER CENTRIFUGAZIONE IN PROVETTA « TEST IN 3 FASI »

1ª FASE: *ambiente salino di NaCl a temperatura ambiente.*

1) Contrassegnare 12 provette per agglutinazione da I a XII;

2) mettere in ciascuna provetta 2 gocce di siero in esame;

3) scuotendo, riportare in sospensione uniforme le sospensioni di eritrociti da I a XI e mettere 1 goccia di ogni sospensione nella corrispondente provetta numerata. Nella provetta XII mettere 1 goccia di una sospensione al 5 % in soluzione fisiologica degli eritrociti in esame (controllo degli autoanticorpi);

4) agitare il contenuto delle provette e lasciar riposare a temperatura ambiente (max fino a 25 °C) per 10 min;

5) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

6) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza.

2ª FASE: *ambiente di albumina bovina a 37 °C.*

1) Mettere in ciascuna provetta 2 gocce di sieroalbumina bovina al 30 %;

2) incubare le provette per 30 min a 37 °C a bagnomaria o per 60 min in termostato;

3) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

4) scuotere il sedimento con precauzione, esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza.

3ª FASE: test *di Coombs*.

1) Lavare gli eritrociti nelle provette da I a XII per 3-4 volte con soluzione fisiologica;

2) mettere in ciascuna provetta 2 gocce di siero antiglobulina umana « normale »;

3) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

4) scuotere il sedimento con precauzione, esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza.

TEST CON ENZIMA (TEST DELLA BROMELINA)

A completamento del « *test* in 3 fasi » è consigliabile, per ogni identificazione di anticorpi, eseguire un *test* enzimatico. Per la sua grande sensibilità, questo *test* è particolarmente indicato nella ricerca dei frequenti anticorpi Rh.

1) Contrassegnare 12 provette per agglutinazione da I a XII;

2) mettere in ciascuna provetta 2 gocce di siero in esame e 2 gocce di soluzione di bromelina;

3) scuotendo, riportare in sospensione uniforme le sospensioni di eritrociti da I a XI e mettere 1 goccia di ogni sospensione nella corrispondente provetta numerata. Nella provetta XII mettere 1 goccia di eritrociti del sangue del soggetto, in sospensione al 5 % in soluzione fisiologica (per controllo degli autoanticorpi);

4) agitare il contenuto delle provette, incubare per 15 min a temperatura ambiente (max 25 °C);

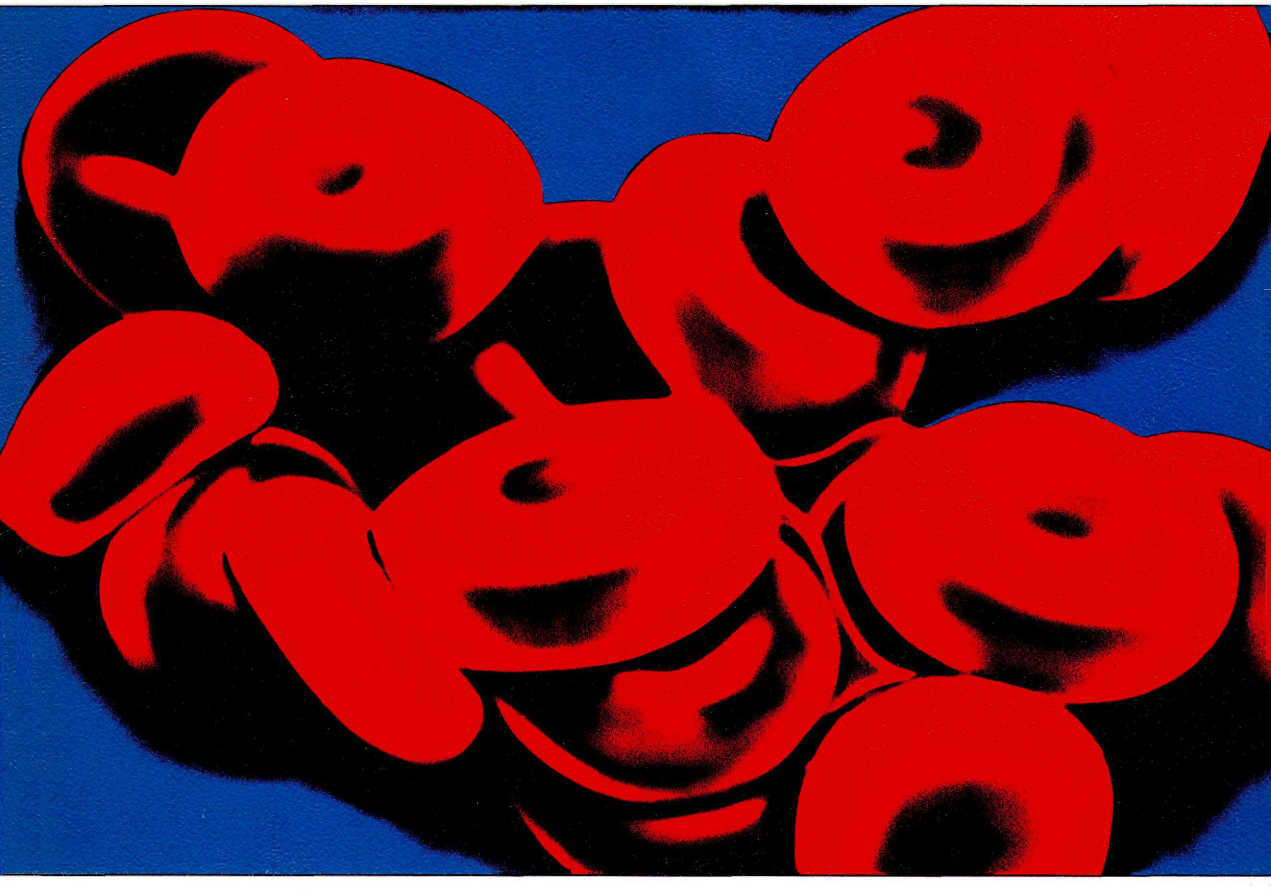
5) centrifugare brevemente a circa 150 x *g*;

6) scuotere il sedimento con precauzione ed esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza.

INTERPRETAZIONE

A parte rare eccezioni, i sieri in esame daranno tipica reazione positiva e negativa con gli 11 campioni di eritrociti-*test*. Si cerca lo spettro di reazione di un campione di siero con l'aiuto del regolo allegato alla confezione di *Sangocell®-I*, che deve essere fatto scorrere lentamente nella sua guaina finché lo spettro di reazione che appare nella finestra della guaina stessa non concorda con quello risultante dall'analisi del siero in esame. In alto si può allora leggere la specificità dell'anticorpo trovata. Se la provetta XII (eritrociti del donatore del siero) mostra anch'essa una reazione positiva, significa che nel siero è presente un autoanticorpo. Ciò dovrebbe venir confermato con un *test* dell'antiglobulina diretto sugli eritrociti del paziente, nonché con una determinazione del gruppo sanguigno sugli eritrociti del donatore del siero. Se si tratta di un autoanticorpo specifico, il gruppo sanguigno da esso indicato deve essere evidenziabile con un siero-*test* sugli eritrociti del donatore del siero.

il test di Coombs



Coombs «normale» e «forte»

Coombs «contrasto»

Coombs specifici (IgG, C_3, C_4)

ISTITUTO BEHRING

E. Behring

eritrociti test

SANGOCELL®

ISTITUTO BEHRING

SA5C175

Applicazioni

LA TRASFUSIONE DI SANGUE

La grande importanza della trasfusione di sangue per la Medicina risulta dal fatto che solo in Italia vengono annualmente eseguite trasfusioni per oltre 1.200.000 U di sangue. Il fabbisogno di sangue conservato mostra tendenza all'aumento.

La trasfusione di sangue umano da una persona all'altra costituisce in linea di principio un « allotrapianto » di tessuto ematico. Corrispondentemente alla sua composizione, in cui figurano componenti cellulari e plasmatiche, molte delle quali hanno carattere di antigene, si può determinare nell'organismo ricevente una immunizzazione con la comparsa di anticorpi immuni contro i più svariati antigeni del sangue estraneo. Una volta che la sensibilizzazione sia subentrata si deve considerare, per una nuova trasfusione di sangue, l'evenienza di reazione da incompatibilità, quale conseguenza della reazione tra gli anticorpi formati e l'antigene estraneo di natura plasmatica o cellulare apportato dall'esterno. Quantunque le nostre conoscenze sulle immunizzazioni di natura non eritrocitaria contro leucociti, linfociti, trombociti, come pure contro componenti plasmatiche quali immunoglobuline, lipoproteine, etc., si siano proprio in questi ultimi tempi continuamente ampliate, le incompatibilità nel sistema eritrocitario sono sempre quelle di maggior rilievo in relazione alla loro importanza clinica.

LA SCELTA DEL SANGUE PER TRASFUSIONE

Tutte le reazioni trasfusionali anti-eritrocitarie di natura immunologica sono dovute all'azione svolta sugli eritrociti da parte degli anticorpi naturalmente presenti o formati a seguito di trasfusioni di sangue (o di gravidanze). Ne consegue precoce eliminazione degli eritrociti, con o senza emolisi intravasale, accompagnata da reazioni generali dell'organismo più o meno evidenti.

Poiché, conformemente alla *legge di Landsteiner*, nel sangue della maggior parte delle persone (ad eccezione delle persone di gruppo AB, dei lattanti, dei vecchi e dei pazienti con sindromi da immunodeficienze) si trovano isoagglutinine o isoemolisine del sistema AB0 è necessario, in caso di trasfusione di sangue, tenere sempre in considerazione il gruppo AB0. La prassi un tempo comune di considerare il sangue del gruppo 0 come « donatore universale » e le persone del gruppo AB come « riceventi universali » è da ritenere superata. Il sangue del gruppo 0 può essere trasfuso in casi urgenti a riceventi del gruppo A o B solo se il plasma non contiene isoemolisine. Questa limitazione non vale quando si tratta di sangue del gruppo 0 che viene trasfuso in forma di concentrato di eritrociti in larga misura esente da plasma, o di eritrociti lavati. In caso di prova crociata *major* negativa (v. oltre), queste frazioni del sangue possono venire somministrate in quantità praticamente illimitata.

La compatibilità tra il sangue del donatore e quello del ricevente, oltre a quella per il sistema AB0, è prescritta, nonostante il grande numero degli antigeni eritrocitari che si conoscono, solo per il fattore D del sistema Rh. L'esperienza ha insegna-

to che quando non vi è sensibilizzazione del ricevente (praticamente non si trovano anticorpi « naturali » del sistema Rh) la prima unità di sangue viene tollerata senza alcuna reazione, mentre in caso di ulteriori trasfusioni compaiono con grande regolarità anticorpi immuni contro il fattore D del sistema Rh. Ciò è dovuto alla immunogenicità particolarmente accentuata di questo fattore. Conseguentemente, gli anticorpi con specificità anti-D sono anche gli anticorpi immuni più frequentemente evidenziabili. Una altrettanto elevata immunogenicità è quella dei fattori c e K. Gli anticorpi anti-*Kell* si osservano tuttavia con relativa rarità, in quanto solo nell'8 % circa della popolazione compare il carattere *Kell* e di conseguenza in meno di un decimo delle trasfusioni di sangue sussiste la probabilità di immunizzazione anti-*Kell*. Presso certi centri di trasfusione si cerca comunque di rispettare la compatibilità anche per i fattori c e K.

Qualora venga dimostrata l'immunizzazione del ricevente, occorre naturalmente che la successiva scelta del sangue sia fatta in funzione del risultato della caratterizzazione degli anticorpi e della prova sierologica di compatibilità.

RICERCHE SIEROLOGICHE PRELIMINARI PER UNA TRASFUSIONE DI SANGUE

Sono necessari i seguenti esami:

1) la determinazione del gruppo sanguigno AB0, compresa la controprova del siero (ricerca delle isoagglutinine), nonché del fattore D del sistema Rh nel donatore e ricevente con 2 diversi sieri-*test* (v. tecnica a pag. 29 e seguenti). I risultati delle determinazioni degli antigeni del sistema AB0 e quelli delle relative agglutinine del siero devono corrispondere tra di loro. Per tutti i campioni di sangue, nei quali non possono venire evidenziati sul siero gli anticorpi naturali AB0 che ci si aspetta, è necessario che la determinazione dei gruppi sanguigni venga ripetuta con altri sieri-*test* o eventualmente con altri metodi. In caso di immunizzazione presunta o dimostrata, può essere necessaria la caratterizzazione di altri fattori dei gruppi sanguigni;

2) per i pazienti nei quali si potrebbe avere immunizzazione (precedenti trasfusioni di sangue, gravidanze o rispettivamente aborti spontanei), si dovrebbe possibilmente far seguire un *test* di ricerca degli anticorpi (v. tecnica a pag. 38 e seguenti). Esso consente di riconoscere tempestivamente una sensibilizzazione precedentemente intervenuta. Con la determinazione della specificità dell'anticorpo può venir facilitata la scelta del sangue del donatore idoneo.

LA PROVA DI COMPATIBILITÀ SIEROLOGICA (PROVA CROCIATA)

La prova di compatibilità è l'ultimo accertamento sierologico prima della trasfusione di sangue, per verificare la compatibilità e per scoprire eventuali scambi ed errori di determinazione. Il suo obiettivo deve essere quello di evidenziare in modo praticamente ottimale tutti gli anticorpi che possono causare reazione da trasfusione. La prova crociata completa consiste nel *test major* (esame del siero del ricevente contro gli eritrociti del donatore) e nel *test minor* (esame del siero del donatore contro gli eritrociti del ricevente). Il *test major* deve venir eseguito in tutti i casi. All'esecuzione del *test minor* si può rinunciare solo in certi casi.

Gli anticorpi sono evidenziati in modo sicuramente ottimale quando viene dimostrata la presenza di:

1) anticorpi completi, attivi in soluzione fisiologica;

2) anticorpi incompleti, attivi in ambiente contenente albumina;

3) anticorpi incompleti, evidenziabili solo nel *test* dell'antiglobulina indiretto;

4) autoanticorpi.

Dato che la temperatura ottimale di reazione dei diversi anticorpi può essere intorno a 37 °C o più bassa, si dovrebbero scegliere le temperature di 20 °C e di 37 °C. Un controllo del sangue del ricevente (siero del paziente contro eritrociti del paziente) è necessario per riconoscere un'agglutinazione. Infine si dovrebbe sempre controllare ancora una volta il gruppo sanguigno AB0 del ricevente e, in caso di trasfusioni massicce, anche quello del donatore immediatamente prima della trasfusione. Il *test minor* serve per evidenziare gli anticorpi nel sangue del donatore. Dato che solo in rari casi questi anticorpi sono causa di reazioni trasfusionali, in pratica si rinuncia per lo più al *test minor*. Normalmente si può ritenere che il sangue conservato che viene messo a disposizione da un Centro trasfusionale sia stato esaminato per accertare l'assenza di anticorpi irregolari. Tuttavia, anche se vi è presenza di forti anticorpi nel sangue del donatore, non è da aspettarsi che il paziente ne soffra in misura rilevante, dato che l'azione di questi anticorpi risulta in larga misura annullata per l'elevata diluizione del sangue del donatore nel circolo del ricevente. Il *test minor* può essere tralasciato quando la trasfusione viene fatta con concentrati di eritrociti. Esso deve venir eseguito quando si ha trasfusione di sangue non uguale per il gruppo AB0 (per esempio sangue 0 per ricevente A o B). Non si tratta qui tanto di evidenziare le isoagglutinine « naturali » (che sono sempre presenti nel plasma di un individuo 0), ma di riconoscere le emolisine (anti-A o anti-B). Se per l'esame si ha a disposizione solo il plasma della provetta pilota, occorre che esso venga portato a coagulazione per ricalcificazione, al fine di eliminare l'azione inibente del citrato sul complemento. Nella miscela di reazione si deve inoltre aggiungere, quale fonte di complemento, del siero umano AB o di gruppo uguale sufficientemente fresco. Il sangue 0 contenente emolisine non può venir trasfuso in persone di gruppo A, B o AB.

TECNICA DELLA PROVA SIEROLOGICA PRELIMINARE

La scelta del metodo deve rispondere al regolamento di applicazione della legge trasfusionale. In linea di principio, la prova sierologica crociata è un doppio *test* di ricerca degli anticorpi con l'impiego del siero del ricevente e degli eritrociti del donatore o rispettivamente del siero del donatore e degli eritrociti del ricevente. Fondamentalmente, la prova crociata può essere eseguita, analogamente al *test* di ricerca degli anticorpi, quale « *test* in 3 fasi » o « *test* in 3 ambienti ».

Il vantaggio del *test* in 3 fasi consiste nel suo basso consumo di materiale nonché nella sua elevata sensibilità. Il *test* su vetrino è invece adatto particolarmente per numerosi esami paralleli. Quale ulteriore vantaggio si può considerare il fatto che tutte le singole reazioni possono venire controllate anche a *test* ultimato. Per quanto riguarda il dispendio di materiale e di lavoro, non vi dovrebbero essere differenze sostanziali.

Descriviamo qui di seguito 2 varianti, che in pratica hanno dato buoni risultati, della prova sierologica di compatibilità nel *test major*, compreso il controllo del sangue del ricevente. Il *test minor* può eventualmente essere eseguito in maniera esattamente parallela.

TECNICA 19 - *Prova di compatibilità in 3 fasi.*

1ª FASE: *fase della soluzione fisiologica.*

1) Contrassegnare 2 provette per agglutinazione con I e II;

2) mettere in ciascuna provetta 2 gocce di siero fresco (non più vecchio di 72 h) del ricevente;

3) dal sangue del donatore (provetta pilota che accompagna il flacone di sangue conservato) preparare una sospensione al 5 % di eritrociti in soluzione fisiologica;

4) mettere nella provetta I 1 goccia della sospensione al 5 % degli eritrociti del donatore;

5) dal sangue del ricevente (sangue per la prova crociata) preparare una sospensione al 5 % circa di eritrociti;

6) mettere 1 goccia della sospensione di eritrociti del ricevente nella provetta II;

7) agitare entrambe le provette, lasciar riposare per 15 min a temperatura ambiente;

8) centrifugare brevemente a 150 x *g*;

9) sul liquido sopranatante esaminare l'emolisi. Successivamente scuotere con precauzione il sedimento ed esaminare l'agglutinazione.

2ª FASE: *fase dell'albumina.*

10) Mettere nelle 2 provette per agglutinazione 2 gocce di sieroalbumina bovina al 30 %. Agitare;

11) incubare le 2 provette per 15-30 min a bagnomaria (o per 30-60 min in termostato a 37 °C);

12) centrifugare brevemente a 150 x *g*;

13) scuotere con precauzione il sedimento ed esaminare l'agglutinazione.

3ª FASE: *fase dell'antiglobulina.*

14) Riempire entrambe le provette per agglutinazione con soluzione fisiologica e lavare accuratamente per almeno 3 volte (v. tecnica a pag. 29);

15) dopo l'ultima centrifugazione versare il liquido sopranatante ed aggiungere in ogni provetta 1-2 gocce di siero antiglobulina umana « normale »;

16) agitare, lasciar riposare per 3 min a temperatura ambiente;

17) centrifugare brevemente entrambe le provette a 150 x *g*;

18) con precauzione esaminare il sedimento mediante illuminazione per trasparenza al fine di stabilire l'agglutinazione.

Parallelamente alla prova crociata, esaminare i gruppi sanguigni AB0 del sangue del donatore e del ricevente con siero anti-A ed anti-B per verificarne la concordanza.

INTERPRETAZIONE DELLA PROVA CROCIATA

1) Tutte le reazioni negative, gruppo sanguigno AB0 del donatore e del ricevente identico: prova crociata negativa. Il sangue del donatore può venire trasfuso;

2) agglutinazione in provetta I e fase 1^a, provetta II negativa: sospetto di anticorpi specifici per un antigene eritrocitario ed attivi a freddo (isoagglutinine AB0, anticorpi anti-Le, anti-M, etc.);

3) agglutinazione in provetta I e fase 2^a, provetta II negativa: sospetto di anticorpi immuni irregolari specifici per antigeni ematici (anticorpi anti-Rh, etc.);

4) agglutinazione in provetta I e fase 3^a, provetta II negativa: sospetto di isoanticorpi specifici per antigeni ematici, attivi nel *test* di Coombs (anti-K, anti-Fy^a, anti-Jk^a, etc.);

5) agglutinazione nelle provette I e II nella fase di soluzione fisiologica: sospetto di agglutinine fredde aspecifiche;

6) agglutinazione nelle provette I e II nella fase di albumina dopo incubazione a caldo: sospetto di autoanticorpi caldi incompleti;

7) *test* di Coombs positivo nelle provette I e II: sospetto di autoanticorpi a caldo, incompleti, liberi;

8) *test* di Coombs positivo solo nella provetta II: sospetto di autoanticorpi a caldo, incompleti, fissati alle cellule. Eseguire il *test* dell'antiglobulina diretto.

TECNICA 20 - Test *di incompatibilità in 3 ambienti.*

1) In ciascuno dei 4 pozzetti di un vetrino mettere 2 gocce di siero fresco (non più vecchio di 72 h) del ricevente;

2) nel pozzetto 1 aggiungere 1 goccia di soluzione di bromelina. Nel pozzetto 3 aggiungere 1 goccia di sieroalbumina bovina al 30 %;

3) dal sangue del donatore (provetta pilota che accompagna il flacone di sangue conservato) preparare una sospensione di eritrociti al 5 %;

4) in ciascuno dei pozzetti 1 e 2 mettere 1 goccia della sospensione di eritrociti al 5 % del sangue del donatore;

5) agitando la provetta pilota preparare una sospensione al 20-40 % circa di eritrociti del sangue del donatore nel proprio plasma ed aggiungere 1 goccia nel pozzetto 3;

6) nel pozzetto 4 aggiungere 1 piccola goccia di sospensione densa di eritrociti del sangue del ricevente nel proprio siero;

7) mescolare bene il contenuto dei pozzetti ed incubare in camera umida per 15 min a temperatura ambiente;

8) fare una lettura intermedia per esaminare l'agglutinazione nei vari pozzetti;

9) incubare successivamente per 45 min a 37 °C in termostato ed esaminare nuovamente l'agglutinazione;

10) *prova crociata con* test *di Coombs indiretto*: mettere 2 gocce di siero fresco del ricevente in provetta per agglutinazione. Aggiungere 1 goccia della sospensione al 5 % di eritrociti del sangue del donatore. Agitare. Incubare per 30 min a bagnomaria. Successivamente riempire la provetta con soluzione fisiologica e lavare accuratamente gli eritrociti del donatore per 3-4 volte. Dopo l'ultima centrifugazione, versare il liquido sopranatante ed aggiungere 1 goccia di siero antiglobulina umana « normale ». Lasciar riposare per pochi min a temperatura ambiente e quindi centrifugare brevemente a 150 x *g*. Esaminare l'agglutinazione con illuminazione per trasparenza;

11) indipendentemente dalla prova crociata, controllare il gruppo AB0 del sangue del donatore e del ricevente con siero anti-A ed anti-B per verificarne la concordanza.

INTERPRETAZIONE

1) Reazioni negative in tutte le fasi: concordanza del gruppo sanguigno AB0 del donatore e del ricevente: prova crociata negativa. Il sangue del donatore può venire trasfuso;

2) agglutinazione in fase di soluzione fisiologica, controllo negativo con il proprio siero: sospetto di isoanticorpi attivi a freddo, completi (anti-A_1, anti-P, etc.);

3) agglutinazione in fase di albumina e bromelina dopo incubazione al calore, controllo negativo con il proprio siero: sospetto di isoimmunoanticorpi irregolari (soprattutto anticorpi del sistema Rh);

4) reazioni su vetrino negative, ma *test* dell'antiglobulina indiretto positivo: sospetto di immunoanticorpi evidenziabili solo nel *test* di Coombs (anti-K, anti-Fy^a, etc.). Si devono escludere autoanticorpi a caldo incompleti mediante *test* dell'antiglobulina diretto ed indiretto con eritrociti propri del ricevente;

5) controllo positivo con il proprio siero e reazioni variabili nelle altre fasi: sospetto di pseudoagglutinazione (formazione di « pile di monete ») o autoanticorpi a caldo incompleti. È possibile far sparire la formazione di « pile di monete » con l'aggiunta di soluzione fisiologica. Gli autoanticorpi a caldo incompleti si riconoscono con il *test* di Coombs diretto ed indiretto.

DISTURBI NELLA LETTURA DELLA PROVA CROCIATA

1) *Pseudoagglutinazione*: si osserva raramente nei soggetti sani e con maggiore frequenza in pazienti con anomalie del metabolismo proteico (iperglobulinemie, paraproteinemie, etc.). Macroscopicamente non è possibile distinguere la pseudoagglutinazione dall'agglutinazione di natura immunologica. Al microscopio la cosa è facilmente possibile perché in uno pseudoagglutinato si riscontra il tipico quadro a « pile di monete ». La formazione di « pile di monete » scompare generalmente dopo l'aggiunta di soluzione fisiologica.

2) *Coagulazione*: il siero proveniente da pazienti con disturbi della coagulazione (per esempio trombocitopenie, coagulopatie, terapia con anticoagulanti) può

coagulare tardivamente o determinare la coagulazione del plasma in ACD della provetta pilota usata per la prova crociata. Gli eritrociti del donatore appaiono allora come avviluppati in una rete. Ciò simula un « agglutinato » che non si dissolve per scuotimento e può essere facilmente scambiato da persone non esperte per agglutinazione di natura immunologica.

3) Autoanticorpi

A) agglutinine a freddo: esse si trovano in pazienti portatori di malattie a decorso cronico con agglutinine a freddo e nelle infezioni da *Mycoplasma.* Talora la loro ampiezza termica può raggiungere la temperatura ambiente e determinare agglutinazioni aspecifiche nella fase della soluzione fisiologica, oppure della bromelina o dell'albumina. È tipico che venga allora agglutinata anche la fase propria del soggetto. Un'agglutinazione non è evidenziabile se si effettua la lettura direttamente prima dell'incubazione alla temperatura voluta;

B) autoanticorpi a caldo incompleti: in seguito alla ricopertura degli eritrociti del ricevente con autoanticorpi incompleti si possono avere una fase propria positiva ed un *test* dell'antiglobulina indiretto positivo. Una differenziazione rispetto agli isoanticorpi specifici per il gruppo sanguigno è possibile con il *test* dell'antiglobulina diretto con eritrociti del paziente.

In caso di comparsa di reazioni trasfusionali si dovrebbero prendere in considerazione ed eseguire i seguenti esami:

1) determinazione del gruppo sanguigno AB0 e del fattore Rh sul campione vecchio, nonché su un nuovo campione di sangue del paziente come pure sul sangue della provetta pilota e sul rimanente sangue conservato;

2) ripetizione della prova crociata completa (*tests major* e *minor* di compatibilità) con l'impiego del campione vecchio e di un nuovo campione di sangue del ricevente e del sangue conservato trasfuso, ivi compreso il *test* dell'antiglobulina indiretto;

3) esecuzione del *test* dell'antiglobulina diretto con il campione vecchio ed un nuovo campione di sangue del ricevente, prelevato direttamente dopo la trasfusione. Se il *test* è negativo con il campione di sangue vecchio, mentre è positivo con il campione nuovo, si può concludere che vi è stata sensibilizzazione *in vivo* ad opera di anticorpi irregolari, attivi nel *test* di Coombs, che reagiscono contro gli eritrociti trasfusi del donatore;

4) determinazione dell'emoglobina libera, dell'LDH e dell'aptoglobina nel siero o nel plasma del ricevente, per il riconoscimento di un'emolisi;

5) ricerca di anticorpi immuni contro componenti cellulari o plasmatiche del sangue non appartenenti alla popolazione eritrocitaria.

MEDICINA PERINATALE

Nella definizione di malattia emolitica del feto o del neonato [detta anche *Morbus haemolyticus fetalis* o *neonatorum* o « eritroblastosi fetale » (MEN)] rientrano diver-

se forme di malattia emolitica del feto o rispettivamente del neonato, che si presentano con il quadro dell'« anemia » dei neonati, dell'« ittero grave » o dell'« idrope universale ». Le diverse forme rappresentano differenti gradi di intensità dello stesso fenomeno patologico. Esse hanno in comune la patogenesi immunologica la quale, come sappiamo dopo la significativa scoperta di LEVINE nel 1939, è basata sul fatto che l'organismo materno durante la gravidanza, ed ancor più all'epoca del parto, viene immunizzato dagli antigeni fetali, per lui estranei, che il feto ha ereditato dal padre. Quale conseguenza di questa immunizzazione, si ha nel sangue della madre la comparsa di isoanticorpi immuni specifici per antigeni ematici. In ragione di speciali particolarità della loro struttura, gli anticorpi immuni, che appartengono alla classe delle globuline IgG, sono in grado di passare attraverso la placenta umana, giungendo nel circolo sanguigno del bambino dove, attaccandosi agli eritrociti del feto che portano l'antigene per cui essi sono specifici, determinano eliminazione accelerata e più forte disgregazione degli eritrociti del bambino. Quantunque sia stato osservato che feti di 12 settimane possono già presentare nei loro eritrociti i segni di sensibilizzazione, il passaggio di anticorpi dal sangue della madre a quello del bambino dovrebbe essere scarso fino alla 20ª settimana di gravidanza. Solo alla fine della gravidanza e all'epoca del parto, nel sangue del bambino giungono grandi quantità di anticorpi e, viceversa, giungono nel circolo materno quantità più abbondanti di sangue fetale. È questa la causa per cui il frutto della prima gravidanza, qualora la madre non sia previamente sensibilizzata (per esempio a seguito di trasfusione di sangue incompatibile o per iniezioni di estratti tessutali), non presenta di norma alcun sintomo clinico, mentre i figli che seguono possono ammalarsi con gravità crescente.

L'antigene di gran lunga più importante e più frequentemente in causa per la MEN è, oltre a quelli del sistema AB0, il fattore D del sistema Rh. La madre Rh-negativo (cde/cde) forma contro gli eritrociti Rh-positivo del proprio bambino (Rh = D) un anticorpo con specificità anti-D. Spesso si trovano anticorpi misti anti-D + anti-C o anti-D + anti-E, quando il bambino presenta il genotipo CDe/cde o rispettivamente cDE/cde. Anticorpi della specificità anti-D vengono trovati in circa il 90 % di tutti i casi di immunizzazione da gravidanza, se non si considera l'eritroblastosi per il sistema AB0. In seguito all'efficace profilassi anti-D della MEN, queste percentuali possono modificarsi in maniera che non è ancora del tutto chiara. I più importanti immunogeni del rimanente sistema Rh sono c ed E, che sono causa di immunizzazione da gravidanza in circa il 6 % dei casi. L'immunogenicità dell'antigene *Kell* è paragonabile a quella degli antigeni c ed E del sistema Rh, tuttavia gli anticorpi anti-K sono più rari, quale causa di MEN, data la frequenza relativamente più bassa di questi antigeni nella popolazione (circa 10 %). Teoricamente, quasi ogni antigene dei gruppi sanguigni può essere la causa di MEN. Una certa importanza pratica hanno tuttavia, oltre ai fattori già citati, soprattutto gli antigeni C, Fy(a), Jk(a), S ed alcuni altri.

Le eritroblastosi sostenute da incompatibilità del sistema AB0 presentano certe particolarità. In complesso esse sono assai frequenti, hanno però di regola decorso blando, che solo in casi relativamente rari rende necessaria l'exsanguino-trasfusione. La combinazione che più frequentemente si incontra è: madre gruppo 0, bambino gruppo A_1. Più rari sono i casi in cui la madre ha il gruppo B, A_1 ed A_2, ed il bambino è A_1B o, rispettivamente, B. Poiché il sangue materno già possiede anticorpi naturali

AB0, che sono potenzialmente dannosi, ne consegue che l'eritroblastosi del sistema AB0 compare frequentemente già nel primo bambino.

È di LEVINE l'osservazione che in caso di incompatibilità contemporanea per i sistemi AB0 ed Rh tra madre e feto (soprattutto con la combinazione madre gruppo 0 e figlio gruppo A oppure B) si manifesta sensibilizzazione anti-D con frequenza pari al 20 % di quella riscontrata nei casi in cui il rapporto tra madre e figlio non è incompatibile a livello del sistema AB0. Probabilmente gli eritrociti A o B del bambino introdotti nella circolazione materna vengono eliminati dalle corrispondenti isoagglutinine della madre tanto rapidamente che l'immunizzazione non si produce o si produce solo raramente. Lo stesso effetto viene utilizzato nella moderna profilassi anti-D con *Rhesogamma®*.

È opportuno che la prevenzione della MEN sia eseguita in ogni gravidanza. La serie di esami consigliata è la seguente:

1) la determinazione del gruppo sanguigno AB0 e del fattore D del sistema Rh (v. tecniche a pagg. 31-34);

2) *test* di ricerca degli anticorpi per evidenziare isoanticorpi del gruppo sanguigno, irregolari al più tardi a metà gravidanza (v. tecnica a pagg. 42 e seguenti). In caso di esito negativo del *test* di ricerca degli anticorpi, questo va ripetuto alla 32ª-36ª settimana di gravidanza. In caso di risultato positivo, si devono determinare e controllare più volte, durante la gravidanza, la specificità ed il titolo dell'anticorpo;

3) se vi è sospetto di immunizzazione già presente o se in precedenza si è evidenziato un anticorpo, dovrebbe essere effettuata una ricerca completa degli anticorpi irregolari, compresa una titolazione, per quanto possibile precoce, nella gravidanza.

PARTICOLARITÀ SIEROLOGICHE DELL'IMMUNIZZAZIONE MATERNO-FETALE

1) Fondamentalmente, si ha comparsa di sensibilizzazione nella madre contro gli antigeni eritrocitari del bambino. Le lesioni possono quindi essere sempre e solo a carico del figlio, mai della madre;

2) azione patogenetica hanno solo quegli anticorpi che riescono a passare attraverso la placenta. Questi appartengono esclusivamente alla classe delle globuline IgG e sierologicamente si comportano di regola come anticorpi incompleti;

3) non esiste un metodo che consenta di evidenziare tutti gli anticorpi che possono essere presenti e che sierologicamente reagiscono in maniera diversa. I singoli metodi possono soltanto completarsi, ma non sostituirsi. Un metodo consigliabile è quello descritto nelle tecniche 16 e 17;

4) gli anticorpi anti-eritrocitari, che si possono evidenziare in bambini con MEN, provengono sempre dalla madre. Questi anticorpi possono essere legati agli eritrociti del bambino oppure, quando compaiono in eccesso, possono circolare liberi nel sangue del neonato. Gli anticorpi fissati alle cellule vengono evidenziati con il *test* dell'antiglobulina diretto con l'impiego di eritrociti del bambino (v. tecnica a pag. 35), gli anticorpi circolanti vengono evidenziati nel siero di sangue del cordone ombelicale (v. tecniche 16 e 17);

5) dimostrare una eritroblastosi AB0 è particolarmente difficile. Il *test* dell'antiglobulina diretto sul sangue del cordone ombelicale, anche nella sua variante in 2

fasi con l'aggiunta di siero AB fresco, è per lo più negativo o solo debolmente positivo. Nel siero di molte persone con il gruppo sanguigno 0 si trovano poi, anche senza gravidanza, anticorpi immuni anti-A ed anti-B, che non è possibile differenziare dagli anticorpi che sono stati indotti dalla gravidanza.

Indicazioni della presenza di eritroblastosi del sistema AB0 si hanno quando:

a) nel siero della madre è evidenziabile un titolo di emolisina aumentato, che può ancora salire durante la gravidanza (v. tecnica a pagg. 41 e 42);

b) si riesce ad evidenziare un anticorpo antagonista nel sangue del cordone ombelicale (per esempio un isoanticorpo della specificità anti-A in un bambino del gruppo sanguigno A_1).

Per la ricerca degli immunoanticorpi nell'eritroblastosi da incompatibilità del sistema AB0 sono stati indicati numerosi metodi (il *test* AB-γ secondo Fischer, il *test* di Coombs modificato secondo Rosenfield, il *test* di Witebsky, il *test* della *pronase* con l'impiego di eritrociti-*test* previamente trattati per via enzimatica, e molti altri ancora). Nell'ambito di questo fascicolo non è possibile scendere nei dettagli. La loro molteplicità rispecchia il dilemma in cui, nonostante tutti gli sforzi, si trova la diagnostica sierologica dell'eritroblastosi del sistema AB0.

6) L'intensità della reazione nel *test* dell'antiglobulina diretto con sangue del cordone ombelicale del bambino non è rigorosamente in correlazione con la gravità del quadro patologico. L'indicazione per l'exsanguino-trasfusione è sempre una decisione clinica. La prova crociata da eseguirsi prima dell'exsanguino-trasfusione deve essere fatta con il siero della madre ed il sangue da trasfondere, dato che nel sangue del cordone ombelicale l'anticorpo, a causa dell'adsorbimento nelle cellule del bambino, può essere troppo debole.

MEDICINA LEGALE

I gruppi sanguigni, quali caratteri geneticamente determinati ed immutabili nel corso dell'intera esistenza, sono particolarmente adatti per chiarire controverse questioni di discendenza, che hanno parte importante nelle perizie sulla paternità ed in genetica. I sistemi di gruppi sanguigni che sono fino ad oggi sufficientemente conosciuti comprendono non solo gli antigeni degli eritrociti, ma anche caratteri ereditari presenti sulle immunoglobuline (gruppi Gm e Inv), sulle α_2-globuline (aptoglobine, globuline Gc), sulle β-globuline (caratteri Ag e Lp), su enzimi di emolisati (fosfatasi acida degli eritrociti, fosfoglucomutasi), sui globuli bianchi (antigeni del sistema HL-A).

In criminologia, lo studio dei gruppi sanguigni ha grande importanza soprattutto per l'identificazione di tracce di sangue e di secreti organici. Grazie alla stabilità, in certi casi considerevole, delle sostanze dei gruppi sanguigni, è possibile determinare anche dopo lungo tempo il gruppo sanguigno di una persona da piccole macchie di sangue essiccato o dal sudore presente negli indumenti.

Bibliografia

1) Boorman K. E., Dodd B. E.: Blutgruppenserologie. Eine Einführung in die Theorie, Methodik und praktische Anwendung - Stuttgart, 1964.

2) Krüpe M.: Das forensische Blutgruppengutachten nach dem heutigen Wissensstand - München, 1970.

3) Levine Ph.: Blutgruppen, Antigene und Antikörper in ihrer Anwendung bei der Bluttransfusion - New Jersey, 1960.

4) Mollison P. L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine - Oxford, 1967.

5) Pettenkofer H. J.: Blutgruppenserologie - Laboratoriumsblätter der Behringwerke, Beiheft. Marburg, 1961.

6) Prokop O.: Die menschlichen Blut- und Serumgruppen - Stuttgart, 1971.

7) Race R. R., Sanger R.: Blood Groups in Man - Oxford, 1968.

8) Richtlinien mit Informationen zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion, aufgestellt vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer - Köln-Berlin, 1968.

9) Spielmann W.: Transfusionskunde. Leitfaden für Studium und Praxis - Stuttgart, 1967.

Supplemento de « La Ricerca in Clinica e in Laboratorio » - Pubblicazione trimestrale edita a cura della Hoechst Italia S.p.A. - Casella Postale n. 1847 - 20100 Milano - Direttore Responsabile: Dr. A. Carandente - Autorizz. n. 108 del Tribunale di Milano del 15 aprile 1965 - Spediz. in abbonam. postale gruppo IV - Stampa: Artegrafica Silva S.r.l. - Cavalli di Collecchio - Parma

PROPERZYM®
diagnostici enzimatici

HOECHST
BEHRINGWERKE AG
MARBURG-LAHN
Behring